

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**Evaluación in vitro antimicrobiana y coagulante de los extractos etanólicos de  
*Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* como  
alternativa terapéutica en Odontopediatría**

**POR**

**MARÍA FERNANDA RUBIO GARZA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE ODONTOPEDIATRÍA**

**ABRIL, 2019**

Evaluación in vitro antimicrobiana y coagulante de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* como alternativa terapéutica en Odontopediatría.

**Comité de Titulación**

---

Dra. Sonia Martha López Villarreal Director de Tesis

---

Secretario

---

Vocal

Evaluación in vitro antimicrobiana y coagulante de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* como alternativa terapéutica en Odontopediatría

**APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA POR COMITÉ DE TESIS**

**COMITÉ DE TESIS**

Dra. Sonia Martha López Villarreal

**Director de Tesis**

Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera

**Co-director**

Dra. Jeannette Ramírez Mendoza

**Director Externo**

Evaluación in vitro antimicrobiana y coagulante de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* como alternativa terapéutica en Odontopediatría.



Este trabajo fue realizado en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León  
bajo la dirección de la Dra. Maria Fernanda Rubio Garza

---

Dra. Sonia Martha López Villarreal

DIRECTOR DE TESIS

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quisiera agradecer a Dios por ponerme en el camino la oportunidad de estar en este programa educativo, el cual ayudó a forjar y fortalecer mis conocimientos en cuanto a la Odontopediatría y catapultar mi carrera profesional como tal, cumpliendo una de mis metas de vida.

A mis padres y mi hermano, quienes siempre tuvieron palabras de aliento cuando más derrotada y cansada me sentía y festejaron conmigo las metas alcanzadas. Gracias por permitirme compartirles mis fracasos y éxitos a lo largo de esta etapa de mi vida. Sin ustedes este camino jamás hubiera sido posible. Les dedico esta tesis y este título a ustedes.

A mi esposo. Gracias por ser paciente conmigo cuando más cansada y estresada me encontraba. Gracias por tus consejos y ánimos a seguir adelante para no rendirme y alcanzar mis metas. Gracias por dejarme compartir contigo mis logros profesionales.

A mis amigas del posgrado, sin ustedes este camino no hubiera sido el mismo. Gracias por las risas!

A mis asesores, la Dra. Sonia Marta López Villarreal, el Dr. Juan Manuel Solís Soto y el Dr. Gustavo Israel Martínez, por su ayuda a realizar este trabajo de investigación. Gracias por sus ideas y sugerencias.

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Nombre, metodología utilizada y compuesto a identificar de las pruebas fitoquímicas realizadas	25
2. Formula de obtención de rendimiento de extractos	62
3. Perfil fitoquímico mediante pruebas químicas para determinar principales grupos químicos presentes	62
4. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus mutans</i> según la concentración del extracto natural de <i>Heterotheca inuloudes</i>	63
5. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus sobrinus</i> según la concentración del extracto natural de <i>Heterotheca inuloudes</i> .	65
6. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus mutans</i> según la concentración del extracto natural de <i>Mentha piperita</i> .	66
7. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus sobrinus</i> según la concentración del extracto natural de <i>Mentha piperita</i> .	68
8. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus mutans</i> según la concentración del extracto natural de <i>Amphyptergium adstringens</i> .	69
9. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus sobrinus</i> según la concentración del extracto natural de <i>Amphyptergium adstringens</i> .	71
10. Comparación de tamaño de halos de inhibición promedio (mm) a diferentes concentraciones <i>Heterotheca inuloides</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Amphyptergium adstringens</i> contra <i>S. mutans</i> .	73

11. Comparación de tamaño de halos de inhibición promedio (mm) a diferentes concentraciones <i>Heterotheca inuloides</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Amphyptergium adstringens</i> contra <i>S. sobrinus</i> .	74
12. Comparación del Tiempo de Protrombina de los grupos experimentales y el grupo control.	81
13. Comparación del Tiempo de Protrombina Parcial Activada de los grupos experimentales y el grupo control.	82
14. Medida de unidades de fluorescencia de menta, cuachalalate, árnica, control positivo y control negativo.	84
15. Porcentajes de viabilidad celular de menta, cuachalalate, árnica, control positivo y control negativo.	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 <i>Heterotheca inuloides</i> (Árnica)	26
2. <i>Mentha piperita</i> (Menta)	28
3. <i>Amphyptergium adstringens</i> (Cuachalalate)	31
4. Flor de <i>H. inuloides</i> “Árnica”	47
5. Hoja de <i>M. piperita</i> “Menta”	47
6. Corteza de <i>A. adstringens</i> “Cuachalalate”	47
7. <i>Mentha Piperita</i> 100 gr	48
8. <i>Heterotheca Inuloides</i> 50 gr	48
9. Solvente etanol al 96%	48
10. Extractos con 900 mL de solvente	48
11. Matraces con extractos en incubadora orbital	49
12. 400 gr de corteza de cuachalalate seco y molido	49
13. Obtención de extracto de cuachalalate en Soxleth	49
14. Destilación en Rotavapor	50
15. Secado en horno	50
16. Extracto de cuachalalate en frasco ámbar	50
17. Prueba de 2-4 dinitrofenilhidracina para identificar grupo carbonilo	51
18. Identificación de carbohidratos	52
19. Prueba de permanganato de potasio para identificar dobles enlaces	53
20. Cromatografía en capa fina	55
21. Inoculación de bacterias en agar	56
22. Agares con bacterias <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	56
23. Preparación de diferentes concentraciones	57
24. Diferentes concentraciones de extractos, control negativo y positivo	57
25. Colocación de discos de papel	57
26. Cajas Petri dentro de incubadora	57



27. Medición de halos de inhibición	57
28. Extracción de sangre	58
29. Tubos de sangre herméticamente cerrados	58
30. Laboratorio de análisis clínicos PROMEDIC, lugar de realización de pruebas de coagulación	59
31. Criovial línea celular fibroblastos humanos ATCC CRL- 7222 Hs274T	60
32. Medio de cultivo	60
33. Placas en incubadoras durante 24 hrs a 37°C	61
34. Lector de placas	61
35. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus mutans</i> según la concentración del extracto de <i>Heterotheca inuloides</i>	64
36. Disco con concentración de 500 µg/mL de extracto de <i>H. inuloides</i> , registrado con halo de inhibición más alto (15 mm) contra <i>S. mutans</i>	64
37. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus sobrinus</i> según la concentración del extracto de <i>Heterotheca inuloides</i>	65
38. Disco con concentración de 500 µg/mL de extracto de <i>H. inuloides</i> , registrado con halo de inhibición con valores más altos contra <i>S. sobrinus</i>	66
39. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus mutans</i> según la concentración del extracto de <i>Mentha piperita</i>	67
40. Disco con concentración de 1000 µg/mL de extracto de <i>M. piperita</i> , registrado con halo de inhibición con valores más altos contra <i>S. mutans</i>	67
41. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus sobrinus</i> según la concentración del extracto de <i>Mentha piperita</i>	68
42. Disco con concentración de 1000 µg/mL de extracto de <i>M. piperita</i> , registrado con halo de inhibición más alto (9mm) contra <i>S. sobrinus</i>	69
43. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus mutans</i> según la concentración del extracto de <i>Amphyptergium adstringens</i>	70
44 Disco con concentración de 1000 µg/mL de extracto de <i>A. adstringens</i> , registrado con halo de inhibición más alto (15mm) contra <i>S. mutans</i>	70
45. Actividad inhibitoria sobre <i>Streptococcus sobrinus</i> según la concentración del extracto de <i>Amphyptergium adstringens</i>	71

46. Disco con concentración de 1000 µg/mL de extracto de <i>A. adstringens</i> , registrado con halo de inhibición más alto (14 mm) contra <i>S. sobrinus</i>	72
47. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 500µg/mL de <i>Heterotheca inuloides</i>	75
48. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 1000µg/mL de <i>Heterotheca inuloides</i>	76
49. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 500µg/mL de <i>Mentha piperita</i>	77
50. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 1000µg/mL de <i>Amphyptergium adstringens</i>	78
51. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 500µg/mL de <i>Amphyptergium adstringens</i>	79
52. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 1000µg/mL de <i>Amphyptergium adstringens</i>	80
53. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para control negativo	81
54. Fluorescencia de extracto de menta a concentraciones de 1000, 500 y 250 ppm	82
55. Fluorescencia de extracto de cuachalalate a concentraciones de 1000, 500 y 250 ppm	83
56. Fluorescencia de extracto de árnica a concentraciones de 1000, 500 y 250 ppm	83

## NOMENCLATURA

UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
ppm	partes por millón
TP	Tiempo de protrombina
TPA	Tromboplastina parcial activada
NaCl	Cloruro de sodio
cm	centímetros
µg	microgramos
msnm	metros sobre nivel del mar
AEP	Acquired Enamel Pellicle
RAM	Reacciones adversas a medicamentos
CHX	Clorhexidina
°C	grados centígrados
INR	Razón Internacional Normalizada
FT	Factor tisular
rpm	revoluciones por minuto
mm	milímetros
mg	miligramos
mL	Mililitros

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
NOMENCLATURA	11
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	18
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
4. ANTECEDENTES	
4.1 Extractos naturales	22
4.1.1 Extractos blandos	22
4.1.2 Extractos firmes o de consistencia pilular	22
4.1.3 Extractos secos	23
4.1.4 Extractos fluidos	23
4.2 Métodos de extracción	23
4.3 Pruebas fitoquímicas	24
4.4 Plantas de interés y su potencial de aplicación	26
4.4.1 <i>Heterotheca inuloides</i> (Árnica)	26
4.4.2 <i>Mentha Piperita</i> (Menta)	28
4.4.3 <i>Amphyptergium adstringens</i> (Cuachalalate)	31
4.5 Enfermedades orales	33
4.5.1 Caries dental	33
4.5.2 Biofilm	33
4.6 Superficie dental	34
4.7 Tratamientos para enfermedades orales y su problemática	34
4.7.1 Costos elevados	34
4.7.2 Uso inadecuado	35
4.7.3 Reacciones adversas a medicamentos (RAM)	35
4.8 Clorhexidina	36
4.8.1 Usos en odontología	37
4.8.2 Substantividad	37
4.8.3 Efectos secundarios	38
4.9 Alternativas terapéuticas naturales	38
4.10 Microorganismos asociados a boca de niños	39
4.11 Actividad antimicrobiana	41
4.12 Tratamientos dentales con riesgo de infección en niños	41

4.12.1 Extracciones	41
4.12.2 Colocación de coronas	41
4.13 Prueba de sensibilidad antimicrobiana mediante difusión en agar con técnica Bauer y Kirby	42
4.14 Coagulación y cicatrización	43
4.15 Pruebas de coagulación	44
4.15.1 Prueba de tiempo de protrombina	45
4.15.2 Tiempo de tromboplastina parcial activada	45
5. MÉTODOS	47
5.1 Selección y preparación de extractos	47
5.2 Identificación de principios activos de extractos mediante pruebas fitoquímicas	51
5.3 Identificación de principios activos de los extractos mediante cromatografía en capa fina	54
5.4 Test de difusión en agar para la verificación de la acción antimicrobiana de <i>Heterotheca inuloides</i> , <i>Mentha piperita</i> y <i>Amphyptergium adstringens</i> sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	55
5.5 Recolección de datos	57
5.6 Pruebas de tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada para evaluación coagulante de <i>Heterotheca inuloides</i> , <i>Mentha piperita</i> y <i>Amphyptergium adstringens</i>	58
5.7 Pruebas de citotoxicidad mediante FMCA	60
6. RESULTADOS	62
7. DISCUSIÓN	85
8. CONCLUSIONES	91
9. REFERENCIAS	93

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León – UANL

Facultad de Odontología

Subdirección de Estudios de Posgrado

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatria

M.C.D. María Fernanda Rubio Garza

**Título:** Evaluación in vitro antimicrobiana y coagulante de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* como alternativa terapéutica en Odontopediatria. **INTRODUCCIÓN:** Existen fármacos que son utilizados en el área de Odontopediatria como antibióticos, agentes antibacterianos o coagulantes antes, durante o después de algún tratamiento dental o enfermedad oral. Aun que suelen ser efectivos, estos medicamentos comúnmente traen consigo efectos adversos y un alto costo. Las plantas representan una alternativa terapéutica natural muy valiosa en medicina y odontología debido a la gran cantidad de compuestos químicos presentes, lo cual les otorga potencial para poder ser utilizados como agentes antimicrobianos, coagulantes, anticoagulantes, cicatrizantes, antiinflamatorios, etc., brindando una oportunidad de aplicar estas propiedades en el control de enfermedades bucodentales con un menor riesgo de efectos adversos y a un menor costo. **OBJETIVO:** El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana, coagulante y toxicidad de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* contra cepas bacterianas de *S. mutans* ATCC y *S. sobrinus* ATCC. **METODOLOGÍA:** Se evaluó la actividad antibacteriana mediante técnica de diluciones a 1000, 500, 250 y 125 ppm por difusión en placa de agar Müller Hinton en técnica de disco, la actividad coagulante mediante pruebas de tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada, y la toxicidad mediante ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay) con en concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 ppm de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* contra *S. mutans* y *S. sobrinus*, complementando esto mediante pruebas fitoquímicas de los extractos obtenidos por identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones coloridas y por medio de separaciones cromatográficas. **RESULTADOS:** *Heterotheca inuloides* y *Amphyptergium adstringens* fueron los extractos con más potencial inhibitorio contra *S. mutans*, sin embargo, *H. inuloides* a una menor concentración que *A. adstringens*. En concentraciones de 1000µg/mL *A. adstringens* obtuvo el halo de mayor diámetro (15 mm), indicando mayor inhibición bacteriana que los otros dos extractos. A concentraciones de 500µg/mL *H. inuloides* obtuvo el halo de mayor diámetro (15 mm). A concentraciones de 250µg/mL y 125µg/mL también fue *H. Inuloides* quien obtuvo el halo de mayor diámetro. En la prueba antimicrobiana de los extractos contra *S. sobrinus*, obtuvimos que *A. adstringens* fue el extracto con más potencial inhibitorio. En concentraciones de 1000µg/mL y 500µg/mL *A. adstringens* obtuvo el halo de mayor diámetro (14 mm y 13 mm respectivamente), indicando mayor inhibición bacteriana que los otros dos extractos. A concentraciones de 250µg/mL y 125µg/mL fue *H. inuloides* quien obtuvo el halo de

mayor diámetro (8 mm en ambas concentraciones). En cuanto a los resultados de las pruebas de coagulación, las pruebas de toxicidad mostraron que menta a 1000 µg/mL funcionaría como un coagulante mientras que cuachalalate a 500 µg/mL funcionaría como un anticoagulante. **CONCLUSIÓN:** Se considera que los extractos de *Heterotheca inuloides* y *Amphyptergium adstringens* son los más específicos para evaluar su desempeño como alternativa terapéutica en la Odontopediatría, no obstante, se recomienda que se realicen más estudios respecto a su selectividad contra mas bacterias cariogénicas, y concluyendo su efectividad continuar con estudios de citotoxicidad y mutagenecidad a diferentes concentraciones que las que fueron utilizadas en esta investigación para garantizar la seguridad para su uso clínico

**PALABRAS CLAVE:** *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita*, *Amphyptergium adstringens*, Odontopediatría, actividad antimicrobiana, coagulación, citotoxicidad

## ABSTRACT

**TITLE:** In vitro evaluation of antimicrobial and coagulant effect of the ethanolic extracts of *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* and *Amphypterygium adstringens* as therapeutic alternative in pediatric dentistry. **INTRODUCTION:** There are drugs used in pediatric dentistry such as antibiotics, antibacterial agents or coagulants before, during or after dental treatment or oral disease. Although they are usually effective, these medications commonly bring with them adverse effects and a high costs. Plants represent a very valuable, natural therapeutic alternative in medicine and dentistry due to the large number of chemical compounds present, which gives them the potential to be used as antibacterial agents, coagulants, anticoagulants, pain relievers, anti-inflammatories, etc., providing an opportunity to apply these properties in the control of oral diseases with a lower risk of adverse effects and at a lower cost. **OBJECTIVE:** The objective of this research was to evaluate the antibacterial activity, coagulant and toxicity of the ethanolic extracts of *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* and *Amphypterygium adstringens* against bacterial strains of *S. mutans* ATCC and *S. sobrinus* ATCC . **METHODOLOGY:** The antibacterial activity was evaluated by dilution technique at 1000, 500, 250 and 125 ppm by diffusion on Muller Hinton agar using disc technique, coagulant activity by means of prothrombin time tests and activated partial thromboplastin time, and toxicity by brine shrimp assay in concentrations of 1000, 500, 250 and 125 ppm of the ethanolic extracts of *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* and *Amphypterygium adstringens* against *S. mutans* and *S. sobrinus*, complementing this with phytochemical analysis tests by means of colorful reactions to verify the chemical compounds that can be found in these plants. **RESULTS:** *Heterotheca inuloides* and *Amphypterygium adstringens* were the extracts with more inhibitory potential against *S. mutans*, although *H. inuloides* at a lower concentration than *A. adstringens*. In concentrations of 1000 µg / mL *A. adstringens* obtained the halo of greater diameter (15 mm), indicating greater bacterial inhibition than the other two extracts. At concentrations of 500µg / mL *H. inuloides* obtained the largest diameter halo (15mm). At concentrations of 250µg / mL and 125µg / mL. It was also *H. Inuloides* who obtained the largest diameter halo. In the antimicrobial test of the extracts against *S. sobrinus*, we obtained that *A. adstringens* was the extract with the most inhibitory potential. In concentrations of 1000µg / mL and 500µg / mL *A. adstringens* obtained the halo of larger diameter (14mm and 13mm respectively), indicating greater bacterial



inhibition than the other two extracts. At concentrations of 250 µg / mL and 125 µg / mL, *H. inuloides* obtained the largest diameter halo (8 mm in both concentrations). **CONCLUSION:** It is considered that the extracts of *Hetherotheca inuloides* and *Amphyptergium adstringens* are the most specific to evaluate their performance as a therapeutic alternative in pediatric dentistry, however, it is recommended that more studies be carried out regarding their selectivity against more cariogenic bacteria, and concluding their effectiveness continue with studies of cytotoxicity and mutation potential at different concentrations than those that were used in this investigation to guarantee their safe, clinical use.

**KEYWORDS:** *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita*, *Amphyptergium adstringens*, children dentistry, antimicrobial activity coagulation, cytotoxicity

## 1.-INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el ser humano ha utilizado plantas como fuente para elaborar medicamentos para combatir infecciones, inflamación y dolor. Uno de los desafíos más importantes en el área de la salud es hacer frente al problema de la resistencia a los antibióticos, lo cual ha llevado a investigadores del área de alimentos, farmacéutica y agricultura a buscar nuevas fuentes, principalmente de origen vegetal, que contengan sustancias con actividad antimicrobiana, que ayuden a combatir cierto tipo de enfermedades.

La salud dental y oral son una parte indispensable de la salud general. La salud oral tiene un efecto sobre la salud general. Llega a tener un impacto en la manera de hablar, la selección de comida que uno ingiere, calidad de vida y bien estar en general. En vista de la prevalencia de enfermedades orales, su impacto en la sociedad y el costo de su tratamiento, las enfermedades orales son consideradas como un problema de salud pública mayor y están listadas junto con otras enfermedades crónicas comunes que afectan a la raza humana.

El hombre a través del tiempo ha encontrado soluciones por medio de los productos naturales para diferentes situaciones, empleándolas de manera alimenticia, medicinal e industrial. Las plantas representan una alternativa muy valiosa en medicina y odontología debido a la gran cantidad de compuestos químicos presentes y su actividad antimicrobiana, lo cual brinda una oportunidad de aplicar estas propiedades en el control de enfermedades bucodentales.

En México, más del 90% de la población general utiliza plantas medicinales en la práctica común para el tratamiento empírico de varias enfermedades. Sin embargo, la mayoría de los médicos no están de acuerdo con el uso de productos vegetales debido a la falta de estudios toxicológicos y farmacológicos. En las áreas urbanas, las recetas para las plantas medicinales son hechas por los vendedores de productos herbarios, mientras que en las zonas rurales las poblaciones se refieren a los curanderos locales, "chamanes", para recibir tratamiento.

El hecho de realizar estudios para encontrar recursos naturales con potencial antimicrobiano y/o coagulante oral nos ayudará a que en un futuro se puedan crear productos

útiles como agentes anti bacterianos o coagulantes que ayuden antes, durante o después de una intervención dental o enfermedad oral. El aprovechamiento de recursos naturales que se pueden encontrar fácilmente en nuestro país abriría la oportunidad de poder ofrecer una alternativa terapéutica accesible, eficiente y sin los efectos adversos que pueden aparecer con el uso de fármacos o compuestos químicos. Nos abre el panorama como odontólogos de poder brindar más opciones de tratamientos a pacientes que se sienten más seguros aplicando tratamientos naturales en su cuerpo.

Existen pocos pero relevantes estudios realizados anteriormente en los extractos naturales escogidos para este trabajo. Las plantas evaluadas en esta investigación, *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* han presentado actividad antimicrobiana, antiinflamatoria e incluso anti fúngica en estudios in vitro, algunos probados en patógenos bucales. Estos descubrimientos abren las puertas a la continuación de estudios como este, con el fin de encontrar alternativas naturales, no perjudiciales, para el trato de enfermedades e infecciones, en este caso, las orales. Con base en lo anterior, se pretende buscar en las plantas alternativas de tratamientos orales. Se planteó evaluar su actividad antimicrobiana, coagulante y grado de toxicidad, agregando pruebas fitoquímicas para su potencial aplicación en la odontología y en especial en la Odontopediatría mediante técnica de diluciones por difusión en placa de agar con técnica de disco, pruebas de tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activado y ensayo flourométrico, respectivamente.

## 2.- HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphiptergium adstringens* muestran propiedades antimicrobianas y coagulantes como alternativa terapéutica en Odontopediatría.

### 3.- OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana, coagulante, y la toxicidad de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* como alternativa terapéutica en Odontopediatría.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obtener los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* mediante la técnica de Soxhlet y/o maceración.
- Calcular el rendimiento en peso seco de cada extracto.
- Caracterizar fitoquímicamente de forma preliminar los extractos obtenidos por identificación parcial de compuestos mediante reacciones coloridas y por medio de separaciones cromatográficas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos contra cepas bacterianas de *S. mutans* ATCC y *S. sobrinus* ATCC mediante técnica de diluciones a 1000, 500, 250 y 125 ppm por difusión en placa de agar Müller Hinton mediante técnica de disco.
- Evaluar la actividad coagulante-cicatrizante de los extractos anteriormente obtenidos seleccionando el de mayor potencial mediante las técnicas de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA o aPTT) y el tiempo de protrombina (PT) a 500 y 1000 ppm.
- Determinar la citotoxicidad de los extractos mediante ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay) en concentraciones de 1000, 500 y 250 ppm.

## **4.- ANTECEDENTES**

La salud oral tiene un efecto en la salud general. La aplicación de productos naturales para la prevención y el control de estas enfermedades es considerada una alternativa interesante a los antimicrobianos sintéticos gracias a su menor grado de efectos negativos y por su esfuerzo en combatir resistencia primaria y secundaria a los medicamentos.

### **4.1 Extractos naturales**

Un extracto es una disolución de los principios activos de una planta en un determinado medio que actúa de disolvente. En todos los extractos hay ciertos principios activos, que son los encargados de otorgar propiedades específicas a cada extracto, que ofrecen distintos beneficios, dependiendo de la planta de donde provenga.

Para elaborar los extractos se puede utilizar la planta completa o las partes que tienen más concentración de principios activos. Se utilizan distintos métodos para obtener los extractos, ya sea por medio de calor o de frío. Los extractos vegetales brindan una presentación más fácil de utilizar los principios activos de las plantas, ya sea de sus hojas, raíces o flores.

Alzate en 1990, descubrió la consistencia ideal que debían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos (Lizcano y González, 2008).

#### **4.1.1. Extractos blandos**

Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa (Lizcano y González, 2008).

#### **4.1.2. Extractos firmes o de consistencia pilular**

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos (Lizcano y González, 2008).

#### **4.1.3. Extractos secos**

Anteriormente se les conocía con la denominación de “sales esenciales”. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5 al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. La forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas (Belga, Norteamericana, noruega y mexicana), pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extractos. Golaz (1973) les dio el nombre de extractos unitarios y los recomienda para la preparación de tinturas y jarabe (Lizcano y González, 2008).

#### **4.1.4. Extractos fluidos**

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada (Barreto J, 1997).

### **4.2 Métodos de extracción**

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación. En el caso de búsqueda de sustancias para la comprobación de actividad biológica, la extracción del material vegetal debe hacerse en agua o con solución disotónica (0.9 %). Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es generalmente mas eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua (Arévalo A, 1996).

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así , para sustancias de baja polaridad ( lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona . Las extracciones pueden hacerse por extracción continua en Soxhlet, en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el

solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal. Por “reflujo”, el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal (Arévalo A, 1996).

Otro método de extracción es mediante maceración en frío , en el cual el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío (Arévalo A, 1996).

#### **4.3 Pruebas fitoquímicas**

El objetivo de un estudio fitoquímico preliminar es determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal, a saber: alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos. Dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, partiendo de los resultados obtenidos de estudios fitoquímico preliminares es posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión y los principios activos involucrados (Newman et al., 2003).



**Tabla 1. Nombre, metodología utilizada y compuesto a identificar de las pruebas fotoquímicas realizadas**

PRUEBA	METODOLOGÍA	COMPUESTO A IDENTIFICAR	SIGNIFICADO DE RESULTADO POSITIVO	COMROBACIÓN
Permanganato de potasio	Agregar 1 mL de permanganato de potasio	Dobles enlaces	Reduce niveles de colesterol	Precipitado color café por dióxido de manganeso
Grupo carbonilo	Bicarbonato de sodio al 10%	Carbonilo	Contiene aminoácidos	Precipitados amarillo, rojo o naranja
Prueba de Liebermann Burchard	Cloruro férrico al 5%	Esteroles y triterpenos	Esteroles: reducen colesterol Triterpenos: contiene propiedades antimicrobianas	Color azul o morado esteroles Color rojizo triterpenos
Cumarinas	Se disuelven 1 o 2 mg de la muestra en solución de hidróxido de sodio al 10% y luego ácido clorhídrico y si desaparece es positivo	Cumarinas	Posee propiedades anticoagulantes	Coloración amarilla que desaparece al acidular
Baljet	A: gramo de ácido picrico disuelto en 100 mL de etanol B: 10 g de hidróxido de sodio disueltos en 100 mL de agua	Sesquiterpenlactonas	Posee propiedades antiinflamatorias, antitumorales, antiviricas	Coloración anaranjada o roja oscura
Quinonas	A 2 o 3 mg de muestra se le añaden 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico	Quinonas	Actúa como laxante	Coloración roja (se confirma añadiendo 2-3 gotas de hidrosulfito de sodio al 5%)
Grupo carboxilo	Prueba de la 2,4 dinitrofenilhidracina (100 mg de 2,4 DFNH + 10 mL de ETOH + 3 mL de HCl aforar a 100 mL con agua destilada.	Carboxilo	Contiene aminoácidos	Desprendimiento de burbujas y anhídrido carbónico
Prueba de Dragendorff mod.	Usándolo como revelador en cromatografía aparece color naranja que debe persistir por 24 horas	Alcaloides	Psicoactivos	Precipitado naranja
Taninos	3 gotas de cloruro férrico al 5% en etanol	Oxhidrilos fenólicos	Posee propiedades astringentes y antiinflamatorias	Coloración verde oscura o negra greñero
Saponinas	Colocación de 3 gotas de agua destilada	Saponinas	Posee acción hemolítica	Formación de espuma abundante
Shinodas	Limadura de magnesio 3 gotas de ácido clorhídrico	Flavonoides	Posee propiedades antioxidantes	Rojo intenso azul violeta verde
Antronas	3 gotas antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado	Carbohidratos	Posee azúcares nutricionales	Aparición de un anillo azul verdoso o violeta

(Benavente-Garcia, 1997, Marjorie, 1999, Harborne, 1980, Zeigler, 2008)

#### 4.4 Plantas de interés y su potencial de aplicación

##### 4.4.1 *Heterotheca inuloides* (Árnica).



Figura 1. *Heterotheca inuloides* (Árnica)

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae, Compositae

Especie: Cass

Género: *Heterotheca*

Nombre común: Árnica, acahuatl,

Principio activo: Aceite esencial, flavonoides, cumarinas, resina, clorofila, tanino, grasas, sustancias colorante amarilla, tanino, ácidos gálicos, oxálicom, goma, almidón, principio amargo y alcaloide

Parte usada: Ramas con flor

(Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Conocida como árnica mexicana, planta herbácea, vellosa, perenne, de 25 a 60cm de altura. Tienen hojas alternas cubiertas de vellos en forma de lanzas y con el borde dentado de 10 a 12cm. Sus flores se agrupan en cabezuelas de color amarillo muy vistoso en forma de disco. De olor débil y sabor amargo. Florece en agosto y septiembre. Es nativa de México distribuida en regiones templadas como Valle de México, San Luis Potosí, Aguascalientes, Chihuahua, Veracruz, Nayarit, Hidalgo, Oaxaca, D.F. y Edo. De México (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Utilizada en tintura alcohólica para contusiones. Se utiliza como desinflamante sobre zonas golpeadas, moretones, desinfectante en cortadas y llagas. Se usa también para el reumatismo, torceduras, inflamación de encías, neuralgia, irritación de garganta, flebitis, y heridas de lenta cicatrización (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

*Heterotheca inuloides* se usa para tratar la hinchazón e inflamación producida por golpes y torceduras, entre otros. Sus propiedades antiinflamatorias se deben especialmente a la presencia de helenalina y dihidrohelenalina en esta hierba. Resultados obtenidos en estudios realizados entre 1997 y 2008 demuestran que *Heterotheca inuloides* es capaz de modular el proceso de inflamación aguda en ratas, ya que puede incrementar la absorción de edema linfático e irrigación local sanguínea al igual que promover la formación de migración de células polimorfo nucleares (Bonamin, 2008).

*Heterotheca inuloides* crece abundantemente en las regiones más frías y templadas de México. Las flores secas de *H. inuloides* conocidas como "árnica" se han utilizado durante mucho tiempo como una medicina popular para el tratamiento tópico de contusiones, moretones y tromboflebitis postoperatoria. Más frecuentemente, esta planta se ha utilizado externamente para el tratamiento de heridas de la piel y lesiones. Además, diferentes metabolitos de *H. inuloides* han sido reconocidos como antioxidantes, por su actividad inhibitoria contra la peroxidación de los lípidos y la hemólisis oxidativa, anti-inflamatorios, analgésicos y citotóxicos efectos contra varias líneas celulares de tumores sólidos y su actividad antimicrobiana. En experimentos anteriores in vivo se observó que los extractos acetónicos y metanólicos de *H. inuloides* y quercetina, mostraron efectos hepatoprotectores contra la toxicidad CCl<sub>4</sub> en ratas (Rzedowski, 2001).

Se encontró que *H. inuloides* posee un efecto protector potencial de extractos acetónicos y metanólicos y quercetina en la inhibición de daño inducido por CCl<sub>4</sub> en diferentes órganos de rata distintos del hígado (Delgado y Olivares, 2001).

Tanto los sesquiterpenoides como los flavonoides han sido reportados por *H. inuloides*. En la búsqueda continua de agentes antimicrobianos de plantas, utilizando 15 microorganismos

seleccionados, *H. inuloides* se encontró que exhiben actividad contra algunas bacterias Gram positivas a 800 µg/mL (Kubo et al., 1994).

#### 4.4.2 *Mentha piperita* (Menta).



Figura 2. *Mentha piperita* (Menta)

Orden: Tubuliflorae

Familia: Labiatae (Lamiaceae)

Género: *Mentha*

Especie: *Mentha piperita* L. (Linnaeus) (Restrepo et al., 2013)

Nombre común: Menta

Principio activo: Mentol, mentona, flavonoides y principio amargo (Delano y Zamorano, 2000).

Parte usada: hojas

Estudios han demostrado que la menta posee actividad antimicrobiana significativa, principalmente gracias a la presencia de monoterpenos oxigenados en su composición química (Hussain et al. 2010). El extracto de *Mentha piperita* ha demostrado actividad antimicrobiana contra bacterias tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton longifusus*, *Micosporum canis* y *Mucor ramamnianus* (Hafedh et al. 2010).

Tiene propiedades antinociceptivos y antipiréticos. Pruebas en ratones donde se obtuvieron altos índices de LD demostraron que el extracto de *Mentha piperita* no es tóxico (Amabeoku et al, 2009).

En otro estudio se experimentó con el extracto metanólico de *M. piperita* por su posible efecto protector contra toxicidad causada por peróxido de hidrógeno en células PC12, actividad antioxidante y la inhibición de propiedades neuroquímicas, inhibición de acetilcolinesterasa y afinidad a receptores gamma-aminobutiricos (A). Se demostraron actividades antioxidantes e inhibitorias de MAO-A (López et al, 2010).

Se aislaron tres flavonoides de *M. piperita*, apigenina-7-0-glucosida, apigenina-7-0-rutinosida y apigenina-7-0-glucuronida usando la genotoxicidad WP2 de *E. coli*. Las propiedades mutagénicas y antimutagénicas de cada flavonoide fueron evaluadas y demostraron tener propiedades antimutagénicas significativas contra la mutagenicidad inducida por 2-AF y N-methyl-N-nitro-N' nitrosoguanidina (Baris, 2011).

El aceite esencial de *M. piperita* contiene compuestos con propiedades de interés biológico. Algunos autores creen que el linalool tiene actividad anti fúngica, antimicrobiana, antitumoral, antimutagénica, analgésica, antiespasmódica, antiinflamatoria, antiparasitaria, anti plaquetaria y antioxidante (Khadir et al., 2016).

Los aceites esenciales obtenidos de las hojas secas de la especie *M. piperita* tienen el compuesto principal linalool (51,0%) en su constitución química. Los resultados están de acuerdo con estudios previos del aceite esencial de *M. piperita* recolectado en Brasil, caracterizando el linalool (51,8%) como el componente principal más importante. Sin embargo, varios estudios de la composición química encontraron que, en otros países, el mentol es el componente principal. La diversidad de compuestos químicos en el aceite esencial de la especie se atribuye a los factores del suelo, la biosintética, y el tiempo de recogida (Dastgerdi et al., 2016).

Los resultados encontrados en este estudio muestran un gran potencial de uso / aplicación del aceite esencial de las especies de *M. piperita* debido a que tiene una clase diversificada de compuestos químicos en actividades antioxidantes, microbianas y citotóxicas. La información obtenida en esta investigación corrobora el uso de especies reportadas por comunidades tradicionales y literatura.

Además, el uso de estas plantas para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades humanas parece razonable y útil. La investigación contribuye a la mejora y agregación de los productos de la biodiversidad brasileña, en el campo de la utilización de las especies e inserción en el tratamiento de la enfermedad subyacente en regiones aisladas donde a veces no se suministran medicamentos en centros de atención primaria (Da Silva Ramos et al., 2017).

En el aceite de menta, los componentes principales son mentol y carvona con cantidades diminutas de mentona y acetato de mentilo. Los principales constituyentes del aceite de *M. piperita* incluyen mentol (19,10%), iso-mentona (14,80%), mentona (14,80%), limoneno (10,60%), iso-mentol (8,80%) y acetato de mentilo 6,60%),  $\beta$ -pineno (5,60%) y  $\alpha$ -pineno (4,80%) (Tyagi y Malik, 2011).

Es importante señalar que esta reportado que la menta tiene propiedades anticoagulantes, siendo de gran utilidad para mejorar la circulación de la sangre y tratar diferentes trastornos derivados de esto, como ser el dolor de cabeza, la hinchazón de las piernas, venas varicosas (Dastgerdi et al., 2016).

#### 4.4.3 *Amphytergium adstringens* (Cuachalalate).



Figura 3. *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate).

##### Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceas

Especie: A. Adstringens

Género: Amphytergium

Nombre común reportado en otros sitios: cuauchalalá, cuachalalate, cuauchalalote, cuauchalalatl, volador, quetchalalatl, mitixeran, yalaguitu.

Principio activo: triterpenos ácidos instipolinasico, oleanolico, masticadienonico y 3-alfa-hidroxi-masticadienonico, una mezcla de ácidos anacardos y aldehídos fenólicos.

Parte usada: Corteza seca del trono del árbol. (Bonilla et al., 2004).

Arboles de hasta 15 mts de alto, con látex lechoso; corteza lisa, grisáceo-rojiza, en ocasiones con protuberancias semejantes a las del género Ceiba. Las ramas con lenticelas orbiculares, elevadas, amarillentas, cicatrices foliares numerosas en el ápice. Hojas aparentando ser verticiladas por reducción de los entrenudos, de hasta 15 cm de largo por 8 de ancho, con 5 y hasta 7 foliolos, el terminal siendo de 2 a 5.5 cm de largo y 1.5 a 6 cm de ancho, generalmente obovado con el ápice obtuso, agudo o truncado, piloso en ambas superficies, margen piloso, crenado o aserrado apicalmente. Inflorescencias masculinas en panículas aglomeradas en el ápice de las ramas, con las flores pediceladas, con cáliz de cinco lóbulos. Las flores femeninas con un

involucro cilíndrico, sin cáliz ni corola. Los frutos son nueces abultadas con estigmas persistentes, sobre los pedicelos aplanados y acrescentes hasta formar una especie de ala, de 3-4 cm, incluyendo el ala, moreno amarillentas o moreno rojizas, con una fina nervadura conspicua, glabras. Contienen 1-2 semillas muy aplanadas de 5 mm de largo. Especie de bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo, en elevaciones de 600 a 1,320 msnm (Bonilla et al., 2004).

La corteza es astringente, contiene taninos. Produce un tinte rojo. Hervida se usa para sanar heridas viejas, para afirmar la dentadura cuando está floja y como remedio para la malaria. También se emplea en curtiduría (Bonilla et al., 2004).

Los taninos encontrados en la corteza del cuachalalate tienen propiedades farmacológicas tales como: astringentes y vasoconstrictoras y estas dos propiedades favorecen en gran medida a la cicatrización. (Carretero Accame, 2000).

*Amphyptergium adstringens* es una planta (árbol) de orígenes mexicanos utilizada por sus propiedades antiinflamatorias y anti ulcerantes. El tronco de su árbol ha sido utilizado para tratar la gastritis, úlceras gástricas, cáncer gastrointestinal, cólicos, fiebre, y dolor dental (González-Stuart, 2010).

Los efectos antiinflamatorios, hipocolesterolémicos, anti fúngicos y antiprotozoarios han sido reportados. Estudios recientes han demostrado que el componente activo responsable de las propiedades de esta planta es el ácido anacárdico, el cual ejerce actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antiitumorales, anti ulcerantes y antimicrobianas (Robles-Zepeda et al, 2011).

La razón principal por la que se usa el cuachalalate es en el tratamiento de gastritis. Sin embargo, su uso no se limita sólo a patologías del sistema digestivo, también tiene una amplia gama de utilidades: aliviar gingivitis, lavar heridas gracias a su capacidad antibacteriana y cicatrizante, como analgésico en dolores óseos y cefaleas y como coadyuvante en el tratamiento de tumores (Robles-Zepeda et al, 2011).



## **4.5 Enfermedades orales**

Las enfermedades orales caen dentro de los problemas de salud más grandes y comunes dentro de las enfermedades crónicas que afectan a la raza humana. Llegan a tener un impacto en la manera de hablar, la selección de comida que uno ingiere, calidad de vida y bien estar en general. En vista de la prevalencia de enfermedades orales, su impacto en la sociedad y el costo de su tratamiento, las enfermedades orales son consideradas como un problema de salud pública mayor y están listadas junto con otras enfermedades crónicas comunes que afectan a la raza humana. Las enfermedades orales se encuentran dentro de la posición 4 en el ranking de enfermedades mas caras de tratar en ciertos países (Sheiham, 2005).

### **4.5.1 Caries dental**

La caries dental es un proceso químico-microbiano que consiste en dos fases o etapas, incluyendo la descalcificación del esmalte seguido del de la dentina. La especie del estreptococo es altamente cariogénica y significativa en el proceso de crecimiento de placa patológica. Un gran número de estreptococos y lactobacilos juegan un rol muy importante tanto en el proceso de la caries dental como en el de las enfermedades periodontales (Siquiera y Rocas, 2005).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la caries dental, aun que demuestra una tendencia en declive en muchas partes del mundo industrializado, sigue siendo una preocupación importante en el ámbito de la salud publica en países en desarrollo. Las estadísticas demuestran que la caries dental afecta a un 60% a 90% de niños en edad escolar (Petersen, 2003).

### **4.5.2 Biofilm**

Los biofilms son comunidades altamente dinámicas y estructuradas de células microbianas firmemente adheridas a una superficie, acomodadas en una matriz extracelular de sustancias poliméricas como exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. La matriz extracelular producida por microorganismos específicos promueve la adhesión y cohesión de microorganismos (Flemming y Winggender, 2010).

Muchas de las enfermedades infecciosas en los humanos son causadas por biofilms virulentos, incluyendo las infecciones orales. Dentro de ellas, la caries dental continua siendo una de las enfermedades bucales más dependientes del biofilm, comprometiendo la salud de niños y adultos (Marcenes et al., 2013). Estas enfermedades son resultado de las interacciones complejas entre microorganismos orales específicos, factores del propio huésped y una dieta que promueve el establecimiento de biofilms cariogénicos. (Russell, 2008).

#### **4.6 Superficie dental**

La superficie dental es única dentro de las superficies del cuerpo, ya que es una superficie dura que no se exfolia y absorbe selectivamente algunas glicoproteínas ácidas (mucinas) de la saliva, formando lo que se conoce como la película del esmalte adquirida (AEP) (biofilm). La AEP es una capa amorfa membranosa que varía en grosor de 0.5 a 2 mm y contiene un alto número de sulfato y carboxilo, lo cual aumenta la carga negativa en la superficie dental. Ya que las bacterias también tienen cierta carga negativa, existe una repulsión inicial entre la superficie dental y las bacterias en la saliva que se acercan a esta superficie. Este mecanismo de defensa innato se quiebra cuando la placa comienza a formarse (Loesche, 1986).

#### **4.7 Tratamientos para enfermedades orales y su problemática**

Distintos agentes antimicrobianos como la clorhexidina, amoxicilina y antisépticos han resultado efectivos para la prevención de caries. Sin embargo, estos materiales han sido relacionados con algunos efectos adversos, tales como la pigmentación dental, barrido de flora microbiana oral e intestinal en su totalidad, y la diarrea (Van Der Weijden et al., 1998).

##### **4.7.1 Costos elevados**

El tratamiento de enfermedades dentales establecidas es muy caro en la mayoría de los casos, y no es considerada una estrategia realista, en especial en el sector de la sociedad económicamente baja. El tratamiento de caries solamente, el cual llega a unos \$3,513 dólares estimados cada 100 niños, es más que el presupuesto total para gastos de salud en niños en países de bajos ingresos. Existe una necesidad inmediata de promover estrategias preventivas que sean socialmente aceptables, accesibles y al mismo tiempo eficientes de costo. Esto llama a una evolución de estrategias preventivas (Petersen, 2003).

#### **4.7.2. Uso inadecuado**

Las técnicas establecidas para la prevención de caries y enfermedades periodontales son el uso de fluoruros en sus diferentes presentaciones y el control mecánico de placa en combinación con un cuidado profesional. Sin embargo, en realidad, una gran parte de la población no maneja la adecuada o correcta técnica de cepillado necesaria para mantener una higiene oral óptima. Esto resulta ser aún mas asertivo en áreas rurales. Los enjuagues bucales antimicrobianos también han sido sugeridos como coadyuvantes en el control mecánico de placa. El agente anti placa comúnmente utilizado es la clorhexidina. El uso de la clorhexidina tiene algunos efectos secundarios adversos como la alteración del sentido del gusto, pigmentación de los dientes y el desarrollo de bacterias resistentes a su aplicación a largo plazo (Shekar et al., 2015).

#### **4.7.3. Reacciones adversas a medicamentos (RAM)**

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) se definen como una respuestas a un fármaco nocivo y no intencionado, y que se produce a dosis normalmente empleadas en el hombre para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad, o para la modificación de la función fisiológica (OMS, 1973). También se define como un efecto indeseable, razonablemente asociado con el uso del fármaco que puede ocurrir como parte de la acción farmacológica de un fármaco o puede ser impredecible en su aparición (Alomar, 2014).

Tomar varios medicamentos, ya sea recetado o de venta libre, contribuye al riesgo de tener una RAM. El número y la gravedad de las RAM aumentan desproporcionadamente a medida que aumenta el número de fármacos consumidos. Es diferente de erudito a erudito, pero el concepto básico de tomar más medicamentos al mismo tiempo que los clínicamente apropiados permanece constante, conocido como polifarmacia (Bushardt et al., 2008). Esto implica la prescripción de demasiados medicamentos para un paciente en particular, con la posibilidad de un mayor riesgo de RAM. Cuanto más los medicamentos que se prescriben más la posibilidad de polifarmacia, esto no significa necesariamente sin embargo que los pacientes no deben tomar muchos medicamentos (Rambhade et al., 2012).

Una razón importante para el desarrollo de RAM a partir de la polifarmacia es la incapacidad de algunos pacientes, especialmente los niños y ancianos para realizar un seguimiento de la utilización de sus medicamentos, independientemente de lo bien que los medicamentos pueden funcionar si se administra por sí solo. Si los pacientes no son lo suficientemente estrictos para tomar los medicamentos según lo prescrito, se separarán del tratamiento y no tomarán el medicamento adecuadamente. El valor económico de los medicamentos puede conducir a omitir algunos de ellos, lo que a su vez provoca escasez de tratamiento y el desarrollo de eventos adversos (dos Santos y Cohelo, 2006).

Los antibióticos sistémicos y los fármacos respiratorios fueron los grupos terapéuticos más asociados con la incidencia de reacciones adversas a medicamentos (RAM). El uso de antibióticos se relacionó con un mayor riesgo de aparición de RAM (Oshikoyay et al., 2011). Los antibióticos no sólo son la clase más prescrita de fármacos para los niños, sino también los que suelen causar RAM. Las RAM más correlacionadas asociadas con los antibióticos son gastrointestinales. Por lo tanto, el sistema digestivo es el más afectado por las RAM, aun que también se puede ver afectado el sistema nervioso central. Además, las RAM cutáneas y gastrointestinales son los eventos más diagnosticados y notificados en farmacovigilancia (De las Salas, 2016).

Los sistemas de órganos más afectados fueron el sistema digestivo (36,6%), el sistema nervioso central (22,3%), la piel y los apéndices (9,8%), los mecanismos de resistencia (8,0%) y el hígado (7,1%) (Martínez-Mir, 1999).

#### **4.8 Clorhexidina**

La Clorhexidina (CHX) ha sido reconocida como el más efectivo compuesto químico para el control de la placa dentobacteriana. Posee un amplio espectro antiséptico con efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas, por lo que desde hace más de tres décadas es considerada como el “estándar de oro” en la práctica odontológica (Mathur et al., 2011).

#### **4.8.1 Usos en odontología**

La Clorhexidina ha demostrado en diversas áreas de la práctica odontológica. En el área de la Periodoncia actúa como coadyuvante en el tratamiento de la gingivitis y la enfermedad periodontal mediante la inhibición de los microorganismos que forman la placa dentobacteriana. Puede coadyuvar en el tratamiento de lesiones ulcerativas recurrentes (Singh et al., 2011).

Es importante mencionar su efecto postquirúrgico al término de tratamientos de diversas cirugías bucales y maxilofaciales así como post extracciones dentales (McCoy et al, 2008).

Entre los usos a mediano término podemos destacar su ayuda para mantener la salud gingival en los pacientes discapacitados. Es de suma utilidad en individuos médicamente comprometidos con predisposición a desarrollar infecciones. Mientras que ha sido benéfica en pacientes con un alto riesgo a caries o portadores de aparatología ortodóntica, así como de implantes (McCoy et al., 2008).

#### **4.8.2 Substantividad**

Respecto al mecanismo de acción, la eficiencia química de CHX se debe a su liberación y disponibilidad en el sitio de acción, durante un tiempo considerable, lo que se conoce como periodo de substantividad. La substantividad es definida como la habilidad del agente para adherirse al tejido dental duro y a tejidos blandos, para luego ser liberada hacia los fluidos orales, durante varias horas y/o días, manteniendo su potencial de acción (Souza-Fihlo, 2008).

A pesar de lo anterior, paradójicamente, dos de las propiedades de CHX, como la substantividad y su acción anti placa, forman parte de algunas de sus principales desventajas, ya que el periodo de substantividad, de acuerdo a los reportes se limita tan sólo a 7 días, aunque en estudios recientes se ha encontrado una duración de hasta 21 días, por lo que este agente tiene un efecto limitado. Por otra parte CHX ha demostrado que no remueve la placa dentobacteriana establecida o madura y los estudios reportan que para que sea realmente efectiva en el

tratamiento de pacientes que cursan con gingivitis y/o enfermedad periodontal, es necesario realizar primero profilaxis y detartrajes en el consultorio dental (Ferraz et al., 2007).

#### **4.8.3 Efectos secundarios**

Los efectos adversos más comunes del uso prolongado de CHX son: la afectación de las papilas gustativas fungiformes y el cambio en la percepción de algunos alimentos, especialmente los salados, se presentan comúnmente manchas amarillas o cafés en los dientes, en la lengua o en dentaduras. Se ha reportado dolor en garganta, así como irritación y dolor en la lengua. En pocos casos se presenta inflamación de la glándula parótida durante el uso de colutorios, ya que se crea una presión negativa en el conducto glandular y aspiración de CHX. En un estudio realizado en veteranos de guerra sometidos a tratamiento con CHX por problemas periodontales se encontró que el 7.1% de los pacientes presentaban sibilancias y dificultad para respirar (Grover, 2008).

#### **4.9 Alternativas terapéuticas naturales**

El 83% de los médicos de familia aceptan el uso terapéutico de la medicina herbal; Además, el 75% lo utiliza como recurso terapéutico. Las plantas más frecuentemente utilizadas son Gordolobo (*Gnaphalium sp.*), Eucalyptus (*Eucalyptus sp.*, Probablemente *E. globulus*), hierbabuena (*Mentha sp.*), Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y cladodas de pera espinosa (partes vegetativas de la chumbera, *Opuntia sp.* Probablemente *Opuntia ficus indica*) (Taddei-Bringas, 1999).

Los extractos naturales de plantas han sido utilizados desde nuestros antepasados como medicinas tradicionales. Hoy en día estos extractos han recibido especial atención ya que son productos libres de químicos y no sintéticos. Estos pueden llegar a demostrar ser mejores y mas seguras alternativas al momento de tratar infecciones o dolores (Shaheen et al., 2015).

Los ingredientes naturales en las plantas medicinales pueden devolver la salud con efectos secundarios mínimos y una eficacia máxima. El uso de productos naturales es un remedio

comprendido que incluye estrategias preventivas para el mantenimiento de la salud oral. Las hierbas naturales usadas de manera simple o en combinación han sido probadas y resultan ser seguras y eficientes para el manejo de ciertas enfermedades orales tales como la halitosis, la gingivitis, úlceras y caries dentales. Los productos vegetales tienen la doble ventaja de tener efectos secundarios mínimos y estar libres de alcohol y/o azúcar, dos ingredientes encontrados en la mayoría de los productos comerciales para el tratamiento de estos padecimientos (Chandra et al., 2015).

El uso de productos naturales y medicinas herbales ha sido documentado en el pasado. Se ha reportado su efectividad en el manejo de muchas infecciones en general. Algunos de estos productos han sido analizados por su potencial antimicrobiano en contra de bacterias orales. El uso de extractos naturales para el control de enfermedades orales/dentales es considerado una alternativa interesante a los antimicrobianos sintéticos gracias a su bajo impacto negativo y para superar la resistencia intrínseca o secundaria de productos medicamentosos (Palombo, 2011).

El uso de extractos naturales para el control de enfermedades orales/dentales es considerado una alternativa interesante a los antimicrobianos sintéticos gracias a su bajo impacto negativo y para superar la resistencia intrínseca o secundaria de productos medicamentosos. Algunas sustancias fitoquímicas encontradas en productos naturales pudieran ofrecer una alternativa efectiva como antibióticos y otros medicamentos, por ende representando un acercamiento prometedor a la prevención y estrategias terapéuticas para la prevención de la caries dental y otras infecciones orales.

#### **4.10 Microorganismos asociados a boca de niños.**

Los microorganismos principalmente presentes en la cavidad bucal de un niño cuando ya hay dientes presentes son *S. mutans* (19 a 31 meses de edad). En niños menores de 18 meses, pueden localizarse frecuentemente aisladas en el dorso de la lengua en un 70% *S. mutans*, 72% de *S. sobrinus*, *P. gingivalis* con 23%, *B. forsythus* en un 11% y *A. actinomycetemcomitans* en un 30% (Bordoni, 2010).

Uno de los agentes etimológicos mas importantes de la caries dental es el *Streptococcus mutans*. Además de ser asociada a la caries, esta bacteria también causa otras enfermedades sistémicas como la colitis ulcerativa, endocarditis y septicemia (Nobbs, 2016).

Existen estudios que comprueban que *S. mutans* y *S. sobrinus* son las bacterias mas relacionadas con la formación de caries dental dentro de las 200 a 300 especies de bacterias aisladas en la placa dental (Loesche, 1986).

Los microorganismos más cariogénicos incluyen a *Streptococo mitis*, *Streptococo mutans*, *Estafilococo aureus*, especies de *Lactobacilos*, entre otros. Estudios han comprobado que la caries dental es causada en parte por una mezcla de bacterias aerobias y anaerobias. La literatura demuestra que varios estudios han sido realizados para analizar la actividad antimicrobiana en medios de cultivo anaerobios, pero pocos estudios se han realizado en medios de cultivo aerobios (Gauniyal y Teotia, 2014).

El biofilm formado por *S. mutans* y su habilidad para promover la formación de este biofilm y otras bacterias orales hace difícil el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria. Por ende, para mantener una buena salud bucal, es importante controlar el crecimiento de *S. mutans* en la cavidad oral (Kryzsciak et al., 2014).

Estudios epidemiológicos consistentemente han demostrado que *S. mutans* y *S. sobrinus* son los microorganismos cariogénicos principales. Un estudio encontró una correlación positiva entre la caries temprana de la infancia (CTI) y ADN de *S. sobrinus* encontrado en cultivos de placa dental, dando evidencia cuantificable que demuestra que *S. sobrinus* juega un papel importante en la formación de CTI. Ambos *S. mutans* como *S. sobrinus* juegan un papel importante en esta enfermedad, y siendo que la CTI es una enfermedad bacterio-dependiente, se puede concluir que la capacidad patológica de estas bacterias es mayor cuando están juntas que cuando están aisladas (Saraithong et al., 2015).



#### **4.11 Actividad antimicrobiana**

La actividad de una sustancia antimicrobiana se define como la habilidad que posee una sustancia química que, a bajas concentraciones, actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento. Algunos ejemplos de antimicrobianos dirigidos a las bacterias son los antibióticos que actúan contra las infecciones humanas o animales, y los biocidas como los desinfectantes y los conservantes. Las pruebas para medir la actividad antimicrobiana se basan en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (halo de inhibición), y se determina por el método analítico mas adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos (Martínez, 2005).

#### **4.12 Tratamientos dentales con riesgo de infección en niños**

##### **4.12.1 Extracciones**

Una vez que una pieza dental ha sido extraída, las bacterias siguen vivas en la boca, especialmente en aquellas personas que tienen una mala higiene oral. Esto hace que las infecciones dentales tras una extracción sean comunes. En algunos casos, los pacientes pueden desarrollar una infección dental después de la extracción, aunque esta no fuera el motivo de la exodoncia. El motivo que la provoca no es otro que las bacterias. Después de una extracción las bacterias están más presentes que nunca en la boca. Las bacterias pueden colarse fácilmente en el alveolo expuesto. Una de las indicaciones post operatorias tras una extracción es el mínimo o nulo cepillado dental cerca del área donde fue realizada la exodoncia durante las primeras 24-48 horas. Muchos pacientes toman ventaja de esta indicación y disminuyen su higiene bucal en su totalidad, facilitando aún más el riesgo a infecciones.

##### **4.12.2 Colocación de coronas**

Una corona dental conlleva el riesgo de sangrado al momento de preparar la pieza dental y estar probando la corona sobre el diente. Se utiliza cemento para sostener la corona dental en su lugar, pero el cemento puede llegar a fluir por debajo de la corona y hacia los tejidos peri coronales. Una corona suelta permite que las bacterias se acumulen en el diente restante y en el periodonto.

Durante todos los procedimientos de restauración bucal, las bacterias pueden infectar las encías alrededor, causando enfermedad periodontal. Eventualmente, una infección de las encías no tratada causa la pérdida ósea, requiriendo un tratamiento adicional.

Aun que durante el tratamiento no surja ningún contratiempo, el paciente debe reforzar sus hábitos de higiene bucal, ya que la colocación de cuerpos extraños para rehabilitar piezas dentarias, como las coronas de acero-cromo o zirconia, aumentan el riesgo de la acumulación de placa.

#### **4.13 Prueba de sensibilidad antimicrobiana mediante difusión en agar con técnica de Bauer y Kirby**

La técnica de difusión en agar, es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente, y está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido. (Woods y Washington, 1995).

En esta técnica, el inóculo bacteriano es llevado a una concentración igual a la del estándar 0.5 de McFarlane, se aplica sobre la superficie de una placa seca de agar Müeller-Hinton que tenga un pH entre 7, 2 y 7,4 medido a temperatura ambiente y una vez solidificado el medio de cultivo la cepa se debe rayar sobre la superficie del medio de forma tal que se logre un crecimiento uniforme. Una vez realizado esto, en un plazo no mayor de 15 minutos, se procede a colocar los discos o las pastillas con el componente a probar. Se emplean placas de Petri de 100 mm de diámetro, el número máximo de discos a colocar es de 5. La placa posteriormente se incuba a 37° y por un periodo no mayor a las 18 horas. Cada plato es observado en una luz indirecta y cada halo de inhibición es medido utilizando un vernier o en su defecto una regla graduada en la forma adecuada. En el caso de que no se presente un halo, no se debe reportar Omm, se debe reportar 5 mm, ya que ese es el diámetro del disco (Woods y Washington, 1995).

Los diámetros alrededor de cada disco son medidos y su interpretación se basa en guías publicadas cada cierto tiempo, por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y el organismo es reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico testado. (NCCLS, 1998).

#### 4.14 Coagulación y cicatrización

Las heridas ocurren cuando se rompe la continuidad de la piel o membrana mucosa. La lesión de los tejidos resulta en sangrado (que puede poner en peligro la vida dependiendo de la gravedad) con la consiguiente activación de reacciones inflamatorias agudas. El sangrado de los vasos sanguíneos dañados en el tejido lesionado debe ser detenido mediante el proceso de hemostasia. La lesión y la respuesta inflamatoria aguda asociada resultan en la necrosis de células especializadas y daños en la matriz circundante y los tejidos del huésped deben activar el proceso de cicatrización para reemplazar los tejidos muertos por otros sanos. Sin embargo, la infección microbiana de la herida daña el proceso de curación y puede retrasar la reparación de tejidos. Además del dolor y las molestias generadas por lesiones o heridas, puede haber alteración de la función que interfiere con la capacidad del individuo de llevar a cabo actividades cotidianas. En consecuencia, existe una necesidad imperiosa de estimular la cicatrización y restaurar las funciones normales de la parte afectada del cuerpo para aliviar la molestia y el dolor asociados con las heridas al detener el sangrado de heridas frescas, prevenir la infección y activar los procesos de reparación tisular (Whaley y Burt, 1996).

La cicatrización es un proceso fisiológico mediante el cual la pérdida de la integridad de la mucosa oral es recobrada y el tejido dañado es reparado. Ese proceso comienza con la hemostasia y se dirige a tres fases dinámicas e interrelacionadas: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación. Estas incluyen migración y transmigración celular, vasoconstricción, vasodilatación, angiogénesis, formación de tejido de granulación y depósito de matriz extracelular (Zambito et al., 2015).

Las bacterias juegan un papel primario en el proceso de fibrinólisis, inflamación y mala cicatrización, lo cual se puede presentar a la hora de encontrarse con una infección en un sitio donde se realizó una extracción dental. El método mas efectivo para reducir el porcentaje de riesgo de este tipo de infecciones es con la aplicación tópica o sistémica de agentes antimicrobianos (Cosyn et al., 2007).

El factor tisular (FT), también conocido como factor III, proporciona esencialmente protección adicional a los órganos vitales propensos a lesiones mecánicas; Su ubicación estratégica se considera como una envoltura hemostática para detener el sangrado de los lechos vasculares.

El FT inicia la coagulación extrínseca que desempeña un papel integral en la coagulación sanguínea, la generación de trombina (FIIa) y la formación de trombos en estrecha relación con la trombosis y las disfunciones cardiovasculares. Tal señalización extracelular procede con la generación secuencial de mediadores coagulantes (FVIIa, FXa y FIIa: serina proteasas activas) y producción de fibrina, todos ellos proinflamatorios. El FT extiende sus funciones a diversos fenómenos biológicos relacionados con cualquiera de estos dos eventos trombóticos e inflamatorios. Evidencia emergente demuestra la participación de FT en reparaciones de heridas, desarrollo embrionario, angiogénesis, metástasis tumoral, adhesión / migración celular, inmunidad innata y muchas condiciones patológicas (Chu, 2011).

#### **4.15 Pruebas de coagulación**

El tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTP) son las pruebas generalmente utilizadas como escrutinio para evaluar la mayoría de los factores de la coagulación. Los factores involucrados en la vía intrínseca de la coagulación son evaluados por el TTP mientras que el TP evalúa a la vía extrínseca, ambos coinciden en los factores de la vía común. Para su realización ambos requieren sangre anti coagulada con citrato de sodio, que funciona como un quelante de calcio. Es muy importante tomar en cuenta que si la cantidad de anticoagulante es inapropiada puede dar resultados muy alterados, que confunden al clínico, debido a que la cantidad de citrato interfiere con el calcio utilizado durante la prueba. Este error se ha disminuido notablemente con los tubos de vacío con presión negativa disponibles en la actualidad, ya que están calibrados para extraer la cantidad exacta de sangre para mantener la proporción adecuada con el anticoagulante (Zimring et al., 2009).

#### **4.15.1 Prueba de tiempo de protrombina**

La prueba del tiempo de protrombina (TP) mide el tiempo que tarda en formarse un coágulo en una muestra de sangre. Un coágulo es una masa espesa de sangre que produce el organismo para sellar escapes de sangre a través de heridas, cortes o roces a fin de evitar el sangrado excesivo.

La capacidad de coagulación de la sangre requiere de la participación de las plaquetas y de unas proteínas denominadas "factores de coagulación". Las plaquetas son células de forma ovalada que se fabrican en la médula ósea. La mayoría de los factores de coagulación se fabrican en el hígado (Zimring et al., 2009).

Esta prueba evalúa específicamente la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. Se usan para determinar la tendencia de la sangre a coagularse ante la presencia de posibles trastornos de la coagulación como la insuficiencia hepática, la deficiencia de vitamina K o cuando la persona esta recibiendo tratamiento anticoagulante (Zimring et al., 2009).

El tiempo de protrombina activa la coagulación cuando se le agrega factor tisular o tromboplastina y calcio; el resultado normal varía de 10 a 14 segundos con >60% de actividad. Dependiendo del tipo de tromboplastina que se agregue el resultado puede variar ampliamente, por lo que se ha desarrollado un método estandarizado para expresar estas variaciones: razón internacional normalizada (INR). La importancia de este parámetro radica en su utilidad para evaluar la efectividad de la anticoagulación con antagonistas de la vitamina K, pero tiene poca utilidad en otros estados de coagulopatía como en la insuficiencia hepática (Zimring et al., 2009).

#### **4.15.2 Tiempo de tromboplastina parcial activado**

El tiempo de tromboplastina parcial activado evalúa la vía intrínseca de la coagulación y la vía común; esta última, junto con el tiempo de protrombina. Para esta reacción al plasma citratado se le agregan fosfolípidos, calcio y un iniciador de los factores de contacto como caolín osfílica. El resultado normal va de 25 a 45 segundos; sin embargo, es importante conocer los

valores de referencia de cada laboratorio. La causa más frecuente de alteración del tiempo de tromboplastina parcial activado es la deficiencia de alguno de los factores de la vía intrínseca, aunque este debe estar con una actividad  $<40\%$  para modificarlo; la mayor incidencia de déficit es la de factor VIII que corresponde a hemofilia A (Zimring et al., 2009).

## 5.- MÉTODOS

### 5.1 Selección y preparación de extractos naturales

El material vegetal fue obtenido de un lugar reconocido de venta. Una muestra de los productos naturales elegidos fue depositada en el herbario de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su identificación taxonómica y la entrega de un certificado de autenticidad. Los extractos fueron realizados en la Unidad de Odontología Integral y de Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Figura 4. Flor de *H. inuloides* "Jamaica"



Figura 5. Hoja de *M. piperita* "Menta"



Figura 6. Corteza de *A. glabra* "Castillaño"

Se obtuvieron los extractos etanólicos de *Mentha Piperita* y *Heterotheca Inuloides* mediante maceración, técnica simple y económica para obtener los extractos de plantas. Se pesaron 100 gr de hoja de *Mentha Piperita* y 50 gr de flor de *Heterotheca Inuloides*. Al material vegetal seco se le adicionó 500 ml de solvente etanol al 96% en 2 matraces de vidrio por separado, los cuales fueron tapados con papel aluminio para evitar salpicaduras durante su posicionamiento en la incubadora orbital y la entrada de contaminantes al producto final. Se hicieron pequeños orificios en el aluminio para que lentamente se fuera evaporando el solvente. Se colocaron los matraces en

la incubadora orbital durante 24 horas. Una vez concluido el tiempo, se filtró el material vegetal y el solvente se extrajo mediante evaporación. El extracto seco fue pesado para obtener el rendimiento.



Figura 7. *Mentha piperita* 100 gr.



Figura 8. *Heterotheca inuloides* 50 gr.



Figura 9. Solvente etanol al 96%  
vente



Figura 10. Extractos con 900 ml de sol-





Figura 11. Matrazos con extractos en incubadora orbital



Figura 12. 400 gr. de corteza de Cuachalalate seco y molido.



Figura 13. Obtención de extracto de Cuachalalate en Soxhlet.

El extracto etanólico de *Amphyptergium adstringens* se obtuvo mediante Soxhlet. 400 gr del material vegetal, seco y molido fue colocado en Soxhlet, adicionando 500 mL del solvente etanol durante 72 horas. Posteriormente se eliminó el solvente mediante un rotaevaporador a presión reducida y se filtró y llevó a sequedad para obtener los rendimientos. Los extractos se colocaron en frascos de color ámbar para evitar cambios debido a la luz.



Figura 14. Destilación en Rotavapor



Figura 15. Secado en horno



Figura 16. Extracto de Cuachalalate en frasco ámbar.

El rendimiento en por ciento de cada extracto se obtuvo a través de la siguiente formula:  

$$\text{gramos obtenidos} / \text{gramos muestra} \times 100.$$

## 5.2 Identificación de principios activos de extractos mediante pruebas fitoquímicas

Luego de la preparación de los extractos etanólicos de cada muestra, fueron sometidos a las pruebas fitoquímicas, realizando los diferentes ensayos mediante reacciones de identificación, por la aparición o no de color o precipitados, para determinar la presencia o no de los siguientes metabolitos:

Dobles enlaces

Grupo carbonilo

Esteroles y Triterpenos

Cumarinas

Sesquiterpenlactonas

Quinonas

Ácidos carboxilos

Alcaloides

Taninos

Saponinas

Flavonoides

Carbohidratos

**Prueba de la 2-4 dinitrofenilhidracina para grupo carbonilo.** De 2 mg de las muestras fueron disueltas en etanol, se les añadió una solución saturada de 2-4-dinitrofenilhidracina en HCl 6N, la formación de un precipitado amarillo o naranja indica la presencia del grupo carbonilo.



Figura 17. Prueba de 2-4 dinitrofenilhidracina para identificar grupo carbonilo.

**Prueba del  $\text{FeCl}_3$  para oxidrilos fenólicos (taninos vegetales).** Se disolvieron 2 mg de las muestras en 1 mL de agua o etanol y posteriormente se añadieron unas gotas de cloruro de fierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.

**Prueba de Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos.** Se mezcló 1 mL de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se le añadió una gota de ácido sulfúrico. Gota a gota se añadió este reactivo a las muestras. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva.

**Prueba de Molish para carbohidratos.** En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se colocaron 2 mg de las muestras, se les agregó gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interface de color púrpura.



**Prueba de las cumarinas.** Se disolvieron 2 mg de las muestras en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

**Prueba de Baljet para Sesquiterpenlactonas.** A 2 mg de las muestras se les agregan 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se torna de color naranja a rojo oscuro.

**Prueba de Shinoda para flavonoides.** En un tubo de ensayo 13 x 100 mm se colocaron 2 mg de las muestras y 1 ml de etanol, se agregó una limadura de magnesio y después se le agregaron unas gotas de HCl. Se considera la prueba positiva si se presentan colores naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

**Prueba de Dragendorff para alcaloides.** A 2 mg de las muestras, se le añaden 2 a 3 gotas de los reactivos A (nitrato de bismuto y ácido acético glacial) y B (yoduro de potasio), la aparición de una coloración naranja a rojiza, se considera positiva.

**Prueba de dobles enlaces.** Se preparó una solución de permanganato de potasio al 2% en agua, se disolvió 0.2 mg de muestra en agua, acetona o metanol y se tomó en capilar agregándole la solución de permanganato de potasio. La prueba es positiva si hay decoloración del reactivo.



Figura 19. Prueba de permanganato de potasio para identificar dobles enlaces.

**Prueba de quinonas.** Las muestras trituradas se trataron con una solución al 5% de hidróxido de potasio en caliente, se filtraron, enfriaron y acidularon. A continuación se sacudieron con benceno y dejaron en reposo. Se separara la fase bencénica a la cual se añadió una solución de hidróxido amónico. La formación de un color rojo indicará la presencia de quinonas.

**Prueba de ácidos carboxilos.** Una pequeña cantidad de los compuestos a examinar se colocaron en un pequeño vidrio de reloj y se añadió una solución de bicarbonato de sodio al 10%. Si es un ácido, se observa el desprendimiento de burbujas de CO<sub>2</sub>.

**Prueba de saponinas.** Se tomaron 5 ml de las muestras en un matraz y se adicionaron 30 ml de agua destilada. Los matraces se pusieron a baño maría hasta alcanzar 60-70 °C, enseguida se agregaron 3 ml de HCl concentrado y se mantuvieron las condiciones durante 15 minutos. Inmediatamente se detuvo la reacción en baño de hielo y se ajustó el pH con NaOH a 6.5 – 7.2. Al final se aforó el volumen a 50 ml y se efectuó la determinación de azúcares por el método de DNS (Miller, 1959), para lo que se usó un espectrofotómetro Jenway 6300.

### **5.3 Identificación de principios activos de los extractos mediante cromatografía en capa fina**

Se separaron los diferentes compuestos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* mediante cromatografía en capa fina. Se cortaron tiras de sílica de gel. Se colocó el extracto con un capilar por punteo dentro de una cubeta cromatográfica junto con los eluente en sus respectivas cubas (cloroformo-metanol 95:5, benceno-acetona 9:1, texano-acetona 9:1). Posteriormente se dejó correr la muestra. El eluente se dejó evaporar para poder llevar a ser rebelado en una caja de luz ultravioleta a 254 y 365 nm, utilizado cloruro de cobalto como revelador. Para finalizar, se llevó a una plancha caliente a 120°C.



Figura 20. Cromatografía en capa fina

#### **5.4 Test de difusión en agar para la verificación de la acción antimicrobiana de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus Sobrinus***

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos elegidos contra sepas bacterianas de *S. mutans* y *S. sobrinus* procedentes del departamento de microbiología oral de la Facultad de Odontología de la UANL mediante difusión en disco de agar preparando una suspensión de microorganismos a 0.05 de la escala de McFarlan. Se evaluaron diferentes concentraciones de la infusión (1000, 500, 250 y 125) inoculando y sembrando 100 mL de medio con bacteria sobre el medio de cultivo Müller Hinton, colocando 5 discos de papel filtro de 5mm cada uno en el agar y adicionando 20 microlitros de cada extracto a evaluar, teniendo como control positivo clorhexidina al 12% y como control negativo agua destilada con alcohol al 5%, incubando las cajas a 37 grados centígrados durante 24 horas.



Figura 21. Inoculación de bacterias en agar



Figura 22. Agares con bacterias *S. mutans* y *S. sobrinus*





Figura 23. Preparación de diferentes concentraciones



Figura 24. Diferentes concentraciones de extractos, control negativo y positivo



Figura 25. Colocación de discos de papel



Figura 26. Cajas Petri dentro de incubadora

## 5.5 Recolección de datos

Para la recolección de datos, se procedió a hacer las lecturas y el llenado de la ficha de recolección a las 13 y 48 horas de haber realizado la siembra, tomando en cuenta la identificación de la muestra, la identificación de la concentración utilizada y la medida en milímetros del halo de inhibición formado.



Figura 27. Medición de halos de inhibición

## 5.6 Pruebas de tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada para evaluación coagulante de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens*

El tiempo de protrombina (TP) es un examen de sangre que mide el tiempo que tarda la porción líquida de la sangre (plasma) en coagularse.

Se realizaron pruebas preliminares para establecer el ensayo definitivo obteniendo sangre de sujeto masculino, sistemáticamente sano, sin ningún tipo de medicación tomada. En el ensayo definitivo, se extrajo la sangre de vena localizada en la parte interior del codo. Se limpió el área de punción con antiséptico. Después se colocó el torniquete alrededor de la parte superior del brazo con el fin de aplicar presión en la zona, lo cual hace que la vena se llene de sangre. Se introdujo la aguja en la vena y se recolectaron 4 tubos con 10 ml sangre cada uno. Se retiró el torniquete, posteriormente la aguja, y se colocó una venda adhesiva para detener el sangrado.



Figura 28. Extracción de sangre



Figura 29. Tubos con sangre herméticamente sellados

Antes de que transcurrieran 30 minutos de la extracción, se centrifugó la sangre a 750 rpm durante 5 minutos. Se separó el plasma y se conservó en refrigeración. Para determinar la actividad coagulante del control negativo se utilizó tromboplastina cálcica. En un tubo de ensayo se colocó 0.2 ml de tromboplastina cálcica y se incubó por 2 minutos. Al terminar los 2 minutos, se agregó

0.1 ml de plasma. Se tomó el tiempo en segundos desde que se colocó el plasma hasta que se comienza a formar un coágulo. Para determinar la actividad de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens*, en lugar de colocar tromboplastina cálcica se colocaron 500µg/mL y 1000µg/mL de cada extracto en tubos de ensayo separados, cada tubo con 0.1 ml de plasma.

Se tomó el tiempo en segundos desde que se colocó el plasma hasta que se comienza a formar un coágulo. Utilizando un coagulómetro se calculó el tiempo de actividad coagulante.

El tiempo de tromboplastina parcial activado también mide la capacidad de la sangre para coagular.

Se realizó una prueba de sangre (descrita previamente) para realizar este examen. La sangre se recogió en un tubo conteniendo citrato sódico al 3.8%, el cual secuestra los iones de calcio y detiene la coagulación. El tubo fue centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos y el plasma obtenido se separó de inmediato para su análisis. Para obtener el control negativo, el plasma se mezcló con un fosfolípido, un activador (silicato) y calcio (para revertir el efecto anticoagulante del citrato). Para medir la actividad coagulante de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens*, el objetivo fue de mezclar el plasma con el fosfolípido, se utilizaron 500µg/mL y 1000µg/mL de cada extracto.



## 5.7 Pruebas de citotoxicidad mediante FMCA

El ensayo fluorométrico (FMCA) se basa en el seguimiento de la fluorescencia que surge como resultado de la hidrólisis por las células con membranas celulares intactas. Se centrifugaron los extractos a 10,000 revoluciones por minuto. Posteriormente se purificaron y esterilizaron los extractos. Cada pocillo se sembró con 1,500,000 células vivas (Criovial línea celular

fibroblastos humanos ATCC CRL-7222 Hs274T). Cada extracto fue añadido en 3 concentraciones: 1000, 500 y 250 ppm.



Figura 31. Criovial línea celular fibroblastos humanos ATCC CRL-7222 Hs274T



Figura 32. Medio de cultivo

Las placas fueron introducidas a una incubadora de Co<sub>2</sub> a continuación durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 h, se eliminaron los extractos y se añadió FMCA (fluorescencia).



Figura 33. Placas en incubadoras durante 24 hrs a 37°C

Las placas se dejaron media hora a 37°C en la incubadora para ser leídas en el lector de placas y medir las unidades de fluorescencia, estableciendo la viabilidad celular.

La viabilidad se cuantificó por triplicado en un fluorómetro de microplacas. La actividad de los compuestos se informó como un efecto sobre la supervivencia celular definida por la fluorescencia en los pocillos experimentales, considerando a las lecturas de control como 100% de viabilidad. A mayor fluorescencia, mayor viabilidad.



Figura 34. Lector de placas

## 6.- RESULTADOS

**Tabla 2. Formula de obtención de rendimiento de extractos**

Gramos obtenidos/Gramos de muestra x 100

EXTRACTO	GR OBTENIDOS	GR MUESTRA	RENDIMIENTO
H. INULOIDES	0.23	50	0.46%
M. PIPERITA	0.19	100	0.19%
A. ADSTRINGENS	52	400	13%

El extracto con mayor rendimiento fue A. adstringens, con un 13%, debido al uso del Soxhlet para la obtención de este extracto. El hecho de ser corteza favorece un mayor rendimiento.

**Tabla 3. Perfil fitoquímico mediante pruebas químicas para determinar principales grupos químicos presentes.**

PRUEBA	COMPUESTO A IDENTIFICAR	SIGNIFICADO DE RESULTADO POSITIVO	RESULTADO Cuachalate	RESULTADO Árnica	RESULTADO Menta
Permanganato de potasio	Dobles enlaces	Reduce niveles de colesterol	+	-	+
Grupo carbonilo	Carbonilo	Contiene aminoácidos	+	+	+
Prueba de Liebermann Burchard	Esteros y triterpenos	Esteros: reducen colesterol Triterpenos: contiene propiedades antimicrobianas	+	+	+
Cumarinas	Cumarinas	Posee propiedades anticoagulantes	-	+	-
Baljet	Sesquiterpenlactonas	Posee propiedades antiinflamatorias, antitumorales, antiviricas	+	+	-
Quinonas	Quinonas	Actúa como laxante	+	+	+
Grupo carboxilo	Carboxilo	Contiene aminoácidos	-	-	-
Prueba de Dragendorff mod.	Alcaloides	Psicoactivos	-	+	-
Taninos	Oxhidrilos fenólicos	Posee propiedades astringentes y antiinflamatorias	+	+	+
Saponinas	Saponinas	Posee acción hemolítica	-	-	+
Shinoda	Flavonoides	Posee propiedades antioxidantes	-	+	+
Antronas	Carbohidratos	Posee azúcares nutricionales	Anillo café	Anillo azul	Anillo azul

Se pudo identificar en el extracto de *Amphyptergium adstringens* (Cuachalalate) la presencia de dobles enlaces, carbonilo, triterpenos, Sesquiterpenlactonas, quinonas, oxhidrilos fenólicos y carbohidratos.

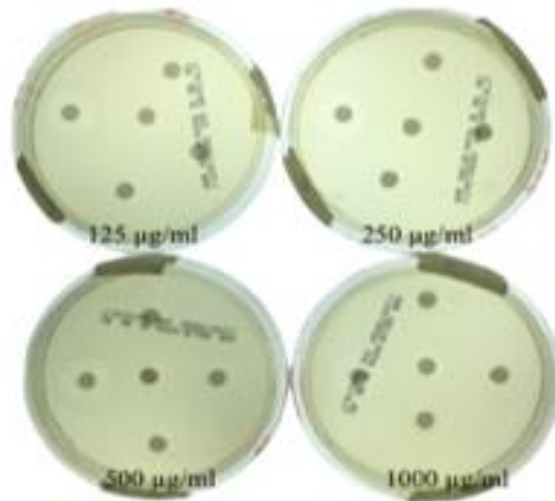
El extracto natural de *Heterotheca inuloides* (árnica) mostró presencia de grupo carbonilo, triterpenos, cumarinas, Sesquiterpenlactonas, quinonas, alcaloides, oxhidrilos fenólicos, flavonoides y carbohidratos.

*Mentha piperita* (menta) respondió positivo a dobles enlaces, grupo carbonilo, triterpenos, quinonas, oxhidrilos fenólicos, saponinas, flavonoides y carbohidratos.

**Tabla 4. Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* según la concentración del extracto natural de *Heterotheca inuloudes*.**

Concentración	Disco 1 (mm)	Disco 2 (mm)	Disco 3 (mm)	Media	DE	Control +	Control -	Valor p
1000	9	8	8	8.33	0.58	18	5	0.9516
500	15	5	8	9.33	5.13	18	5	0.0584
250	9	6	6	7.00	1.73	22	5	0.8321
125	11	5	5	7.00	3.46	12	5	0.0532

En los halos de inhibición de las cuatro concentraciones evaluados se observó actividad bactericida. La actividad bactericida mas alta fue registrada en un diámetro de 15 mm a concentración de 500 µg/ml, mientras que la mas baja fue registrada en un diámetro de 5 mm a concentración de 125 µg/ml. Para el grupo de control positivo el valor más alto se ubica en el halo de 22 mm de manera bactericida.



**Figura 35.** Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* según la concentración del extracto de *Heterotheca inuloides*.



**Figura 36.** Disco con concentración de 500 µg/ml de extracto de *H. inuloides*, registrado con halo de inhibición mas alto (15mm) contra *S. mutans*.



**Tabla 5. Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus sobrinus* según la concentración del extracto natural de *Heterotheca inuloides*.**

Concentración	Disco 1 (mm)	Disco 2 (mm)	Disco 3 (mm)	Media	DE	Control +	Control -	Valor p
1000	7	5	8	6.67	1.53	14	5	0.7634
500	8	7	8	7.67	0.58	13	5	0.8414
250	5	8	5	6.00	1.73	14	5	0.7395
125	5	8	8	7.00	1.73	16	5	0.7749

En los halos de inhibición de las cuatro concentraciones evaluados se observó actividad bactericida. Los diámetros más altos fueron registrados bajo concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$ , variando en 7 y 8 mm, mientras que la más baja fue registrada en un diámetro de 5 mm a concentración de 1000, 250 y 125  $\mu\text{g/ml}$ . Para el grupo de control positivo el valor más alto se ubica en el halo de 16 mm de manera bactericida.



**Figura 37. Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus sobrinus* según la concentración del extracto de *Heterotheca inuloides*.**

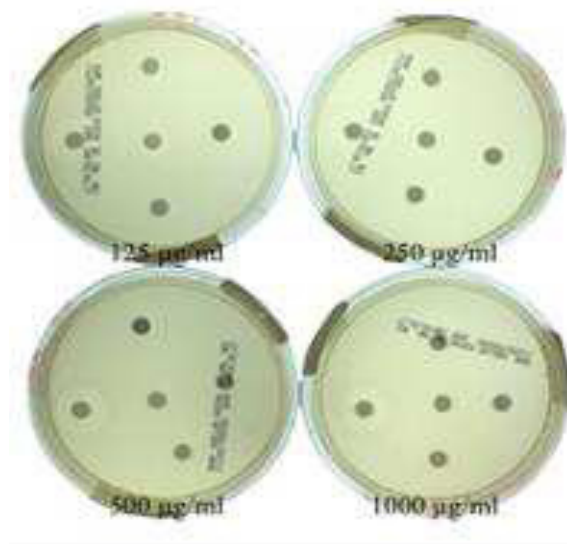


**Figura 38.** Disco con concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de *H. inuloides*, registrado con halo de inhibición con valores mas altos contra *S. sobrinus*.

**Tabla 6.** Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* según la concentración del extracto natural de *Mentha piperita*.

Concentración	Disco 1 (mm)	Disco 2 (mm)	Disco 3 (mm)	Media	DE	Control +	Control -	Valor p
1000	10	9	9	9.33	0.58	14	12	0.8313
500	5	5	6	5.33	0.58	15	5	0.9611
250	5	5	5	5.00	0.00	15	5	0.9432
125	5	5	5	5.00	0.00	15	5	0.8516

La actividad bactericida mas alta fue registrada en un diámetro de 10 mm a concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la mas baja fue registrada en un diámetro de 5 mm a concentración de 500, 250 y 125  $\mu\text{g/ml}$ . Para el grupo de control positivo el valor más alto se ubica en el halo de 15 mm de manera bactericida.



**Figura 39.** Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* según la concentración del extracto de *Mentha piperita*.

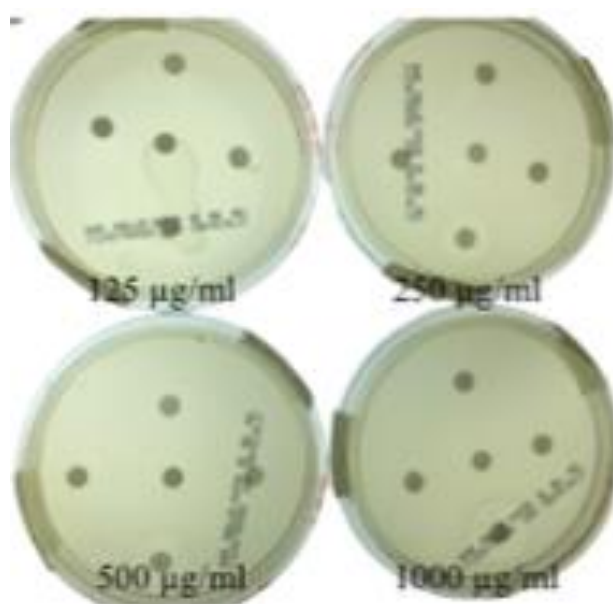


**Figura 40.** Disco con concentración de 1000 µg/ml de extracto de *M. piperita*, registrado con halo de inhibición con valores mas altos contra *S. mutans*.

**Tabla 7. Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus sobrinus* según la concentración del extracto natural de *Mentha piperita*.**

Concentración	Disco 1 (mm)	Disco 2 (mm)	Disco 3 (mm)	Media	DE	Control +	Control -	Valor p
1000	6	9	5	6.67	2.08	14	5	0.4543
500	7	5	5	5.67	1.15	16	5	0.8843
250	5	5	5	5.00	0.00	16	5	0.9432
125	5	5	5	5.00	0.00	14	5	0.8516

La actividad bactericida mas alta fue registrada en un diámetro de 9 mm a concentración de 1000 µg/ml, mientras que la mas baja fue registrada en un diámetro de 5 mm, obtenido bajo todas las concentraciones. Para el grupo de control positivo el valor más alto se ubica en el halo de 16 mm de manera bactericida.



**Figura 41. Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus sobrinus* según la concentración del extracto de *Mentha piperita*.**

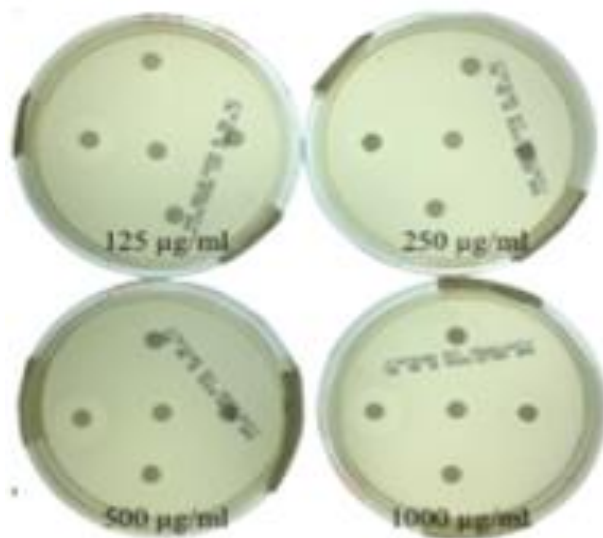


**Figura 42.** Disco con concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de *M. piperita*, registrado con halo de inhibición mas alto (9mm) contra *S. sobrinus*.

**Tabla 8.** Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* según la concentración del extracto natural de *Amphyptergium adstringens*.

Concentración	Disco 1 (mm)	Disco 2 (mm)	Disco 3 (mm)	Media	DE	Control +	Control -	Valor p
1000	12	15	13	9.33	4.51	14	5	0.0367
500	6	10	6	8.33	4.93	14	5	0.0239
250	5	5	5	7.67	4.62	13	5	0.0233
125	5	5	5	8.67	6.35	16	5	0.0233

La actividad bactericida mas alta fue registrada en un diámetro de 15 mm a concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la mas baja fue registrada en un diámetro de 5 mm a concentración de 250 y 125  $\mu\text{g/ml}$ . Para el grupo de control positivo el valor más alto se ubica en el halo de 16 mm de manera bactericida.



**Figura 43.** Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* según la concentración del extracto de *Amphyptergium adstringens*.



**Figura 44.** Disco con concentración de 1000 µg/ml de extracto de *A. adstringens*, registrado con halo de inhibición mas alto (15mm) contra *S. mutans*.

**Tabla 9. Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus sobrinus* según la concentración del extracto natural de *Amphyptergium adstringens*.**

Concentración	Disco 1 (mm)	Disco 2 (mm)	Disco 3 (mm)	Media	DE	Control +	Control -	Valor p
1000	10	14	10	10.00	4.36	15	5	0.0239
500	9	6	13	10.33	4.16	15	5	0.0268
250	5	7	5	8.33	5.77	15	5	0.0233
125	5	5	5	9.00	6.93	17	5	0.0233

La actividad bactericida más alta fue registrada en un diámetro de 14 mm a concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la más baja fue registrada en un diámetro de 5 mm a concentración de 250 y 125  $\mu\text{g/ml}$ . Para el grupo de control positivo el valor más alto se ubica en el halo de 22 mm de manera bactericida.



**Figura 45. Actividad inhibitoria sobre *Streptococcus sobrinus* según la concentración del extracto de *Amphyptergium adstringens*.**



**Figura 46. Disco con concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de *A. adstringens*, registrado con halo de inhibición más alto (14mm) contra *S. sobrinus*.**

En la prueba antimicrobiana de los extractos contra *S. mutans*, obtuvimos que árnica y cuachalalate fueron los extractos con más potencial inhibitorio, aunque árnica a una menor concentración que cuachalalate. En concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$  cuachalalate obtuvo el halo de mayor diámetro, indicando mayor inhibición bacteriana que los otros dos extractos. A concentraciones de 500 $\mu\text{g/mL}$  árnica obtuvo el halo de mayor diámetro. A concentraciones de 250 $\mu\text{g/mL}$  y 125 $\mu\text{g/mL}$  también fue árnica quien obtuvo el halo de mayor diámetro.

En la prueba antimicrobiana de los extractos contra *S. sobrinus*, obtuvimos que cuachalalate fue el extracto con más potencial inhibitorio. En concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$  y 500 $\mu\text{g/mL}$  cuachalalate obtuvo el halo de mayor diámetro, indicando mayor inhibición bacteriana que los otros dos extractos. A concentraciones de 250 $\mu\text{g/mL}$  y 125 $\mu\text{g/mL}$  fue árnica quien obtuvo el halo de mayor diámetro.



**Tabla 10. Comparación de tamaño de halos de inhibición promedio (mm) a diferentes concentraciones *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita*, *Amphyptergium adstringens* contra *S. mutans*.**

EXTRACTO	1000µg/mL	500µg/mL	250µg/mL	125µg/mL
H. INULOIDES (ARNICA)	8.33	9.33	7.00	7.00
M. PIPERITA (MENTA)	9.33	5.33	5.00	5.00
A. ADSTRINGENS (CUACHALALATE)	9.33	8.33	7.67	8.67

En la prueba antimicrobiana de los extractos contra *S. mutans*, obtuvimos el mismo promedio más alto para todos los extractos, aunque árnica a una menor concentración que menta y cuachalalate. En concentraciones de 1000µg/mL cuachalalate obtuvo el halo de mayor diámetro, indicando mayor inhibición bacteriana que los otros dos extractos. A concentraciones de 500µg/mL árnica obtuvo el halo de mayor diámetro. A concentraciones de 250µg/mL y 125µg/mL también fue cuachalalate quien obtuvo los mayores promedios de inhibición bacteriana. Los promedios más bajos los obtuvo menta a concentraciones de 250 y 125 µg/mL.

**Tabla 11. Comparación de tamaño de halos de inhibición promedio (mm) a diferentes concentraciones *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita*, *Amphyptergium adstringens* contra *S. sobrinus*.**

EXTRACTO	1000µg/mL	500µg/mL	250µg/mL	125µg/mL
H. INULOIDES (ARNICA)	6.67	7.67	6.00	6.00
M. PIPERITA (MENTA)	6.67	5.67	5.00	5.00
A. ADSTRINGENS (CUACHALALATE)	10.00	10.33	8.33	9.00

En la prueba antimicrobiana de los extractos contra *S. sobrinus*, obtuvimos que cuachalalate en promedio fue el extracto con más potencial inhibitorio en todas las concentraciones. El menor diámetro promedio fue obtenido por menta a 250µg/mL y 125µg/mL.



**PROMEDIC**  
Laboratorio de Análisis Clínicos

**Promedic Laboratorio**

Av. Sendero Divisoria #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 81(81)83-07-45-51



Página: 5/5

Fecha: 11/OCT/2017 16:11:43

Paciente:	DAVID HERNANDEZ ESTRACIO A 500	Id:	111017052
Registro:	HES0001011987	Sexo:	M
Medico:	A QUIEN CORRESPONDA	Edad:	30 años
Origen:	FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS	Fecha:	11/OCT/2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
<b>HEMATOLOGÍA</b>			
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.80	seg	TESTIGO - - 13.13*
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.40	seg	TESTIGO - - 13.13*
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.50	seg	TESTIGO - - 13.13*
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.80	seg	TESTIGO - - 33.19*
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.70	seg	TESTIGO - - 33.19*
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.70	seg	TESTIGO - - 33.19*

(\*) valores fuera de rango

**Figura 47. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 500µg/mL de *Heterotheca inuloides***



**PROMEDIC**  
 Laboratorio de Análisis Clínicos

**Promedic Laboratorio**  
 Av. Sendero Divisoria #181, Local 18  
 Matra Escobedo, N.L.  
 Tel: 91(81)83-87-45-81



Pags: 1/1
 Fecha: 11/10/2017 18:12:44

Paciente:	DAVID HERNANDEZ ESTRACIO A 1000	Id:	111017253
Registro:	HEE0001011817-2	Sexo:	M
Medico:	A QUEEN CORRESPONDA	Edad:	30 años
Origen:	FAULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS	Fecha:	11/OCT/2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
<b>HEMATOLOGÍA</b>			
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.80	seg	TESTIGO = - 13.13"
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.30	seg	TESTIGO = - 13.13"
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.50	seg	TESTIGO = - 13.13"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.60	seg	TESTIGO = - 33.15"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.10	seg	TESTIGO = - 33.15"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.60	seg	TESTIGO = - 33.15"

(\*) valores fuera de rango

**Figura 48. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 1000µg/mL de *Heterotheca inuloides***

**PROMEDIC**  
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Benito Juárez #101, Local 10

Matita Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)55-87-45-81

Página: 1/1

Fecha: 11/10/2017 10:11:25

Paciente: DAVID HERNANDEZ ESTRACIO MMS  
Registro: H0150010119573  
Médico: A QUEEN CORRESPONDA  
Origen: FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Id: 111017054  
Sexo: M  
Edad: 30 años  
Fecha: 11/OCT/2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia		
<b>HEMATOLOGÍA</b>					
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.90	seg	10.50-13.00	-	-
			13.13*		
TIEMPO DE PROTROMBINA	14.00	seg	10.50-13.00	-	-
			13.13*		
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.80	seg	10.50-13.00	-	-
			13.13*		
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	33.80	seg	10.50-13.00	-	-
			33.18*		
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	34.10	seg	10.50-13.00	-	-
			33.18*		
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	34.10	seg	10.50-13.00	-	-
			33.18*		

(\*) valores fuera del rango

**Figura 49. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 500µg/mL de *Mentha piperita***



PROMEDIC

Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisoria #101, Local 18

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-87-45-81



Págs: 1/1

Fecha: 11/OCT/2017 16:14:07

Paciente:	DAVID HERNANDEZ ESTRAC TO M1999	Id:	111017055
Registro:	HEED001011987-4	Sexo:	M
Médico:	A QUIEN CORRESPONDA	Edad:	30 años
Origen:	FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS	Fecha:	11/OCT/2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia	
HEMATOLOGÍA				
TIEMPO DE PROTROMBINA	14.20	seg	TESTIGO	- -
			13.13"	
TIEMPO DE PROTROMBINA	14.50	seg	TESTIGO	- -
			13.13"	
TIEMPO DE PROTROMBINA	14.80	seg	TESTIGO	- -
			13.13"	
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	42.40	seg	TESTIGO	- -
			33.38"	
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	43.00	seg	TESTIGO	- -
			33.38"	
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	38.10	seg	TESTIGO	- -
			33.38"	

(\*) valores fuera de rango

**Figura 50. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 1000µg/mL de *Mentha piperita***



**PROMEDIC**  
 Laboratorio de Análisis Clínicos

**Promedic Laboratorio**  
 Av. Sendero Divisadero #101, Local 15  
 Santa Fe, Coahuila, S.L.  
 Tel. 018122-67-45-01



Page: 1/1
 Fecha: 28/10/2018 15:06:22

Paciente:	DAVID ALEJANDRO EXTRAÑO 1 (586)	Id:	281018037
Registro:	EX0000111867	Sexo:	M
Médico:	A QUEEN CORRESPONDA	Educ:	25 años
Origen:	PUBLICO EN GENERAL	Fecha:	28/OCT/2018

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
<b>HEMATOLOGÍA</b>			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.80	seg	TESTIGO - -
			12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.30	seg	TESTIGO - -
			12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.40	seg	TESTIGO - -
			12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.80	seg	TESTIGO - -
			32.8"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.10	seg	TESTIGO - -
			32.5"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.30	seg	TESTIGO - -
			32.5"

(\*) valores fuera de rango

**Figura 51. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 500µg/mL de *Amphytergium adstringens***



**PROMEDIC**  
 Laboratorio de Análisis Clínicos

**Promedic Laboratorio**  
 Av. Sendero Divisoria #101, Local 15  
 Merit Escobedo, N.L.  
 Tel: 01(81)83-67-45-51



Hoja: 1/1
 Fecha: 28/10/2018 13:06:50

<b>Paciente:</b> DAVID ALEJANDRO EXTRAUTO 1 (1996) <b>Registro:</b> EX1001011987 <b>Médico:</b> A QUIEN CORRESPONDA <b>Origen:</b> PUBLICO EN GENERAL	<b>Id:</b> 281018038 <b>Sexo:</b> M <b>Edad:</b> 25 años <b>Fecha:</b> 28/OCT/2018
--	---

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia		
<b>HEMATOLOGÍA</b>					
TIEMPO DE PROTROMBINA	15.20	seg	TESTIGO	-	-
			12.4"		
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.70	seg	TESTIGO	-	-
			12.4"		
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.60	seg	TESTIGO	-	-
			12.4"		
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	77.30	seg	TESTIGO	-	-
			32.6"		
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	75.00	seg	TESTIGO	-	-
			32.6"		
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	78.60	seg	TESTIGO	-	-
			32.6"		

(\*) valores fuera de rango

**Figura 52. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para 1000µg/mL de *Amphyptergium adstringens***





**Figura 53. Resultados de laboratorio de tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada para control negativo**

**Tabla 12. Comparación del Tiempo de Protrombina de los grupos experimentales.**

Grupo	Media	DE	Valor p
Heterotheca inuloides (500)	13.57	0.06	0.01721
Heterotheca inuloides (1000)	13.53	0.32	0.03331
Mentha piperita (500)	13.87	0.89	0.00074
Mentha piperita (1000)	14.50	0.30	0.00091
Amphyptergium adstringens (500)	12.60	0.26	0.01645
Amphyptergium adstringens (1000)	12.83	0.32	0.10142

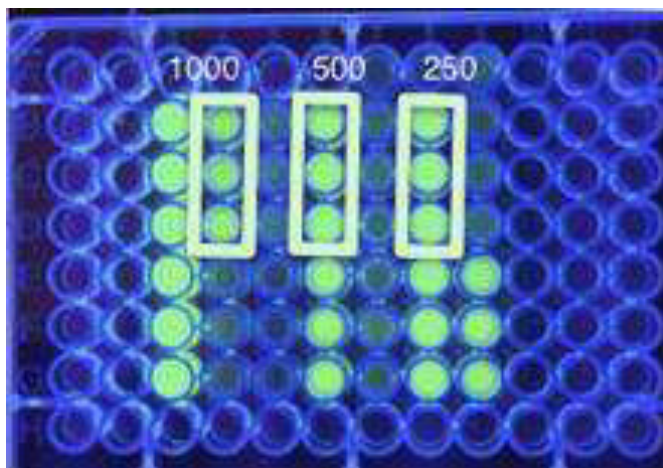
El promedio del menor tiempo de coagulación de acuerdo al tiempo de protrombina fue obtenido por cuachalalate a una concentración de 500 µg/mL. El promedio mas alto fue obtenido por menta en concentración de 1000 µg/mL, por lo cual de acuerdo a estos resultados, menta a 1000 µg/mL funcionaría como un anticoagulante mientras que cuachalalate a 500 µg/mL funcionaría como un coagulante.

**Tabla 13. Comparación del Tiempo de Protrombina Parcial Activada de los grupos experimentales.**

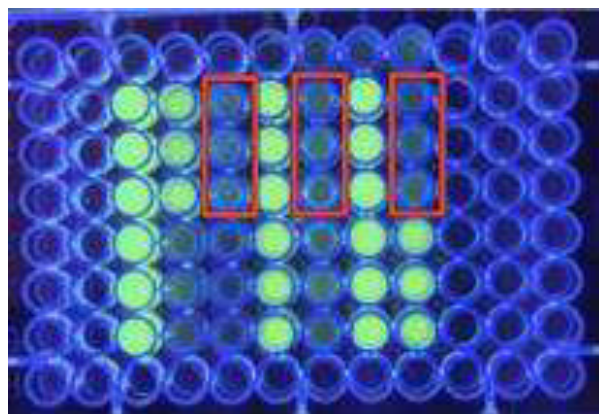
Grupo	Media	DE	Valor p
Heterotheca inuloides (500)	35.73	0.06	0.00010
Heterotheca inuloides (1000)	35.73	0.32	0.00032
Mentha piperita (500)	38.80	0.89	0.00025
Mentha piperita (1000)	41.50	2.10	0.00120
Amphyptergium adstringens (500)	52.47	0.57	0.00000
Amphyptergium adstringens (1000)	76.40	2.76	0.00001

Los tiempos del control negativo en las pruebas de protrombina parcial activada variaron entre 32.70 y 33.30 segundos. De acuerdo a los resultados obtenidos agregando los extractos estudiados, el promedio del menor tiempo de coagulación fue de árnica en ambas concentraciones utilizadas. El promedio más alto fue obtenido por cuachalalate en un concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Existe una diferencia significativa en los tiempos de cuachalalate, los cuales se prolongan. Por lo tanto, cuachalalate a 1000  $\mu\text{g/mL}$  se considera que puede interferir con el proceso de coagulación.

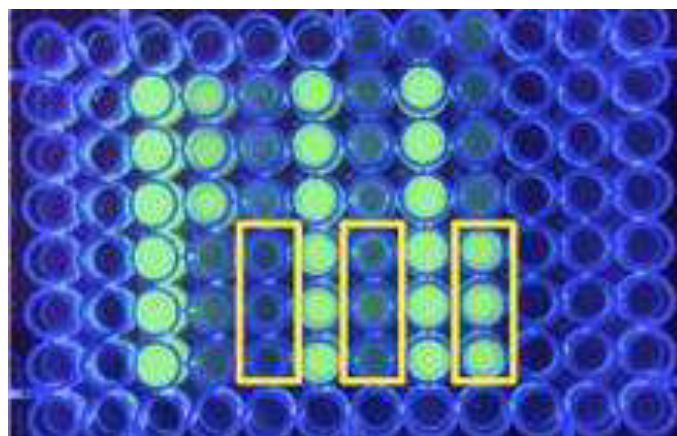
**Figura 54. Unidades de fluorescencia que muestran la viabilidad celular de extracto de menta a concentraciones de 1000, 500 y 250 ppm.**



**Figura 55. Fluorescencia de extracto de cuachalalate a concentraciones de 1000, 500 y 250 ppm.**



**Figura 56. Fluorescencia de extracto de árnica a concentraciones de 1000, 500 y 250 ppm.**



**Tabla 14. Medida de unidades de fluorescencia de menta, cuachalalate, árnica, control positivo y control negativo.**

Extracto	1000 ppm	500 ppm	250 ppm
Control negativo	1,500,000	1,500,000	1,500,000
Control positivo	1,500,000	1,500,000	1,500,000
Menta	750,000	1,100,000	1,300,000
Cuachalalate	90,000	86,000	95,000
Árnica	27,000	83,000	680,000

El extracto con mayores medidas de unidades de fluorescencia (células vivas) fue menta a sus tres concentraciones. A 1000 ppm se contabilizaron 750,000 células, a 500 ppm fueron 1,100,000 células y a 250 ppm 1,300,000 células. Árnica a 250 ppm obtuvo 680,000 células vivas mientras que cuachalalate en todas las concentraciones no obtuvo valores por encima de las 500,000 células vivas.

**Tabla 15. Porcentajes de viabilidad celular de menta, cuachalalate, árnica, control positivo y control negativo.**

Extracto	1000 ppm	500 ppm	250 ppm
Control negativo	100%	100%	100%
Control positivo	100%	100%	100%
Menta	34.5%	58.7%	75%
Cuachalalate	5.6%	5.3%	5.9%
Árnica	1.6%	5.1%	42.5%

El extracto con mejor porcentaje de viabilidad celular fue menta a 250 ppm con un 75%. Cuachalalate y árnica no obtuvieron porcentajes por encima del 50% en ninguna de las tres concentraciones probadas.

## 7.- DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana, coagulante, y la toxicidad de los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* contra *S. mutans* y *S. sobrinus*, se diseñó un experimento en el cual se comparó la presencia de grupos químicos así como la capacidad de los extractos vegetales de inhibir el crecimiento de microorganismos a través de una prueba de sensibilidad antimicrobiana, usando Clorhexidina como control positivo, teniendo en cuenta que es un antiséptico de amplio espectro activo en técnicas in vitro contra un gran número de bacterias.

Diversos estudios se han realizado para demostrar las diferentes propiedades de los extractos evaluados en este trabajo.

En nuestro país, Delgado et al en el año 2001 reportaron que *Heterotheca inuloides* mostró actividad antimicrobiana e inhibitoria, así como propiedades citotóxicas y antioxidantes, encontraron que un extracto cetónico de árnica mostró propiedades antiinflamatorias in vivo cuando se evaluó en edemas inducidos en ratones. Aún se siguen estudiando sus efectos antiinflamatorios y analgésicos

Guadarrama Reyes en el 2013 comparó el efecto antibacteriano de las nano partículas de planta versus clorhexidina sobre *Streptococcus mutans*. Para *Heterotheca inuloides* obtuvo una media de 6.9, desviación estándar de .41, un valor mínimo de 6.6mm y un máximo de 7.4mm, sugiriendo que las nanopartículas de esta planta presentan un efecto antibacteriano importante.

Kooa y cols. en el 2000 evaluaron la actividad antimicrobiana de árnica sobre 15 microorganismos, incluyendo *S. sobrinus* ATCC 6715 y *S. mutans* Ingbritt 1600 mediante el método de difusión en agar y midiendo las zonas de inhibición del crecimiento. En este caso, el extracto de árnica no demostró actividad antimicrobiana significativa.

En la investigación de Pichilingue Cruz en el 2015, se evaluó el efecto cicatrizante de una crema dérmica formulada con árnica, a concentraciones de 0.5% y 1.5% p/v, y se comparó su efecto cicatrizante con un producto comercial para determinar el grado de cicatrización. se utilizaron 12 ratones, a los cuales se indujo una herida de 1 cm de longitud y 0.2 cm de profundidad, para posteriormente aplicar el tratamiento con la crema en experimentación a diferentes concentraciones. Los resultados demuestran que la tintura del árnica, tiene efecto cicatrizante a una concentración en estudio 0.5% y 1.5%, así mismo, la comparación con la crema cicatrizante comercial demostró tener un mayor efecto cicatrizante en la experimentación. Se concluyó que la crema elaborada a base de árnica tiene efecto cicatrizante a las concentraciones 0.5% y 1.5%, con un grado de diferencia significativa de 1,000 frente al producto comercial.

Comparando estos estudios con nuestros resultados en las pruebas aplicadas a *Heterotheca inuloides*, obtuvimos que fitoquímicamente, *H. inuloides* mostró presencia de grupo carbonilo, triterpenos, cumarinas, Sesquiterpenlactonas, quinonas, alcaloides, oxhidrilos fenólicos (taninos), flavonoides y carbohidratos (antranas). En cuanto a las pruebas antimicrobianas, obtuvimos resultados positivos contra *S. mutans* en todas las concentraciones, teniendo la mayor inhibición bacteriana a concentraciones de 500µg/mL, dando un halo de 15mm, y la menor inhibición a concentración de 1000µg/mL y 250µg/mL, ambas concentraciones presentando halos de 9mm. Para la prueba contra *S. sobrinus*, se obtuvieron resultados positivos en todas las concentraciones, dando mayor inhibición en concentraciones de 500µg/mL, 250µg/mL y 125µg/mL resultando todas en halos de 8mm. A concentraciones de 1000µg/mL se midió un halo de 7mm.

En un estudio realizado por Ahmed en el 2015 demostró la fuerte actividad antioxidante y antibacteriana del aceite esencial de la menta, después de estudiar su reacción en 22 muestras in vitro de 5 patógenos bacterianos, atribuido a su alto contenido de flavonoides, convirtiéndolo en una buena alternativa para el tratamiento cardiovascular y de garganta.

Maraví en el 2012 determinó el efecto antibacteriano y anti fúngico in vitro del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), mediante el método de difusión en agar con disco, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, utilizando el aceite esencial de menta al 50 y al 100%, teniendo como control positivo clorhexidina. El aceite esencial de menta al 100 % tuvo un promedio en los halos de inhibición de  $11,65 \pm 0,97$  mm. No se consideró significativo el resultado del aceite esencial de menta al 50%, ya que dicho aceite presentó un promedio de 0 de halo de inhibición frente a *Streptococcus mutans*. *Mentha piperita* (menta) al 50%, que tuvo una acción menor que los controles positivos.

En el 2014, Mahboubi examinó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Mentha piperita* en 23 especies bacterianas, incluyendo *S. mutans* y *S. sobrinus*. Comprobó que dicho aceite poseía efecto antimicrobiano sobre *S. mutans*, mas no sobre *S. sobrinus*.

Comparando estos estudios con nuestros resultados en las pruebas aplicadas a *Mentha piperita*, obtuvimos que fitoquímicamente, *Mentha piperita* (menta) respondió positivo a dobles enlaces, grupo carbonilo, triterpenos, quinonas, oxhidrilos fenólicos (taninos), saponinas, flavonoides y carbohidratos (entronas). En cuanto a las pruebas antimicrobianas, obtuvimos resultados positivos contra *S. mutans* en concentraciones de 1000µg/mL, dando un halo de 10mm de diámetro. No hubo respuesta positiva bajo las demás concentraciones del extracto contra *S. mutans*. Para la prueba contra *S. sobrinus*, se obtuvieron resultados positivos solamente bajo las concentraciones de 1000µg/mL y 500µg/mL, dando halos de 9mm y 7mm, respectivamente.

Rodríguez-García y colaboradores en el 2015 evaluaron in vitro la actividad antimicrobiana y anti proliferativa del extracto metabólico de *A. adstringens* contra patógenos orales como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans* y *Candida dubliensis*, utilizando métodos como micro dilución y difusión en agar, demostrando un amplio potencial antimicrobiano y anti proliferativo, siendo este útil en un futuro como alternativa antimicrobiana para el tratado de infecciones orales y la prevención y tratamiento del cáncer.

Rocha en el 2015 midió la inhibición bacteriana de *A. Adstringens* a diferentes concentraciones contra *S. sobrinus*. A excepción de la biopelícula de 5mg/ml, la cual no mostró actividad inhibitoria después de 24 ni 48 horas, La biopelícula adicionada con el extracto de *Amphipterygium adstringens* a diferentes concentraciones presentaron inhibición de crecimiento después de 24 horas. La adicionada con 6 mg/ml de extracto resultó en un halo de 13mm, la de 12 y 70 mg de 14mm, la de 25 de 18 mm y la de 50 mg de 15mm. La adicionada con el control positivo de 17 mm.

También, Rocha en el 2015 cuantificó el contenido de fenoles totales equivalentes en mg de ácido gálico por gramos de extracto crudo para determinar cuál concentración de las que utilizaba en sus pruebas sería la que contenía mayor cantidad de fenoles. La concentración de 6 mg/ml exhibió 0.07342 µg de fenoles; la de 12 mg/ml de 1.29ug; la de 25 mg/ml de 2.5 µg; la de 50 mg/ml de 5.55 µg y la de 70 mg/ml de 7.69 µg. Concluyó que el cuachalalate o *A. adstringens* posee una gran variedad de sustancias que la hacen tener propiedad farmacológicas, entre las que destacan están los fenoles. A parte de ser un agente antibacterial también se le atribuye propiedades cicatrizante y antioxidante por lo que fue conveniente cuantificar la cantidad de fenoles presentes en los discos poliméricos.

Comparando estos estudios con nuestros resultados en las pruebas aplicadas a *Amphipterygium adstringens*, obtuvimos que fitoquímicamente *A. adstringens* se identificó la presencia de dobles enlaces, carbonilo, triterpenos, Sesquiterpenlactonas, quinonas, oxhidrilos fenólicos (taninos) y carbohidratos (antranas). En cuanto a las pruebas antimicrobianas, obtuvimos resultados positivos contra *S. mutans* en concentraciones de 1000µg/mL y 500µg/mL, resultando halos de 15mm y 10mm respectivamente. Bajo concentraciones de 250µg/mL y 125µg/mL no hubo inhibición bacteriana significativa. Para la prueba contra *S. sobrinus*, se obtuvieron resultados positivos bajo concentraciones de 1000µg/mL, 250µg/mL y 125µg/mL, resultando halos de 14mm, 13mm y 7mm, respectivamente. No se presenció inhibición en concentraciones de 125µg/mL.



Sotelo et al., en el 2010, realizaron el análisis fitoquímico y pruebas preliminares para la detección de metabólicos secundarios del extracto natural del fruto del borojó. A los extractos etanólicos se les practicaron diferentes ensayos con reacciones químicas de identificación, mediante cambios de color o formación de precipitados, para determinar la presencia de los metabolitos secundarios: flavonoides (Shinoda, Pew's, reacción con vapores de amonio y prueba de NaOH); triterpenos (Liebermann-Buchard); lactonas insaturadas (método Legal); glicósidos (Kedde); y polifenoles solubles (cloruro férrico). Al encontrar diferentes metabolitos secundarios presentes en el extracto, Sotelo et al., concluyeron que el potencial del extracto en la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética no puede atribuirse a la presencia de una sola molécula del fruto, sino a la acción de los compuestos de carácter fenólico que ejercen efectos sinérgicos, formando un fitocomplejo activo.

Además de las pruebas microbiológicas, de coagulación y de citotoxicidad aplicadas a nuestros extractos, decidimos complementar la investigación con un análisis fitoquímico mediante diferentes ensayos con reacciones químicas de identificación, con cambios de color o formación de precipitados, para determinar la presencia de los metabolitos secundarios. Coincidimos con la conclusión de Sotelo et al., acerca de esta prueba, dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, dando la posibilidad de orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión en diferentes industrias.

Cruz-Carrillo en el 2010 preparó extractos etanólicos, a partir de las hojas secas de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*, los cuales, fueron sometidos a un análisis microbiológico in vitro, para establecer su actividad antibacteriana y bactericida, en respuesta a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* mediante difusión en disco. Las cepas diluidas se sembraron masivamente sobre el agar Müller Hinton y se colocaron en la superficie del medio cinco discos de papel de filtro (Whatman) de 6mm de diámetro, impregnados con 0,2mL de cada uno de los extractos puros y agua destilada, como control negativo y se incubaron a 37°C, por 24 horas. La prueba fue efectuada por triplicado. Posteriormente, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos. Este método

Concordando con el caso anterior, este método facilitó la evaluación del potencial antibacteriano de los extractos en cuestión. A diferencia de la investigación de Cruz-Carrillo, nuestros discos de papel filtro fueron de 5mm en lugar de 6mm.

Para comprobar el efecto del extracto de las hojas de *Ricinus communis* sobre la formación del coágulo sanguíneo, Apecechea Coffigny et al en 1998 realizaron pruebas de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada, teniendo como fundamento su uso clínico en el control primario de pacientes bajo el tratamiento con anticoagulantes orales y en el empleo del control de la terapia con heparina.

Al igual que en esta investigación, concordamos que es un método seguro ya que estas son pruebas empleadas en pacientes diagnosticados con trastornos de coagulación, los cuales requieren tipos de estudios como estos para conocer el estado de su tiempo de coagulación y saber si sus tratamientos son funcionales o no.

Marquez Vizcaíno et al en el 2005 realizaron también pruebas de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada para estudiar la actividad coagulante de *Brownea ariza*. El anticoagulante usado fue citrato de sodio al 3,8%. La sangre citratada, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, recuperándose el plasma pobre en plaquetas. Se preparó el extracto y las fracciones a una concentración de 500 mg/mL usando como vehículo solución salina, para determinar cual extracto y fracción presentaba reacción de coagulación sobre plasma pobre en plaquetas. Se prepararon concentraciones de 500, 250, 50, 10 y 1 mg/mL.

Para nuestras pruebas también utilizamos citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante, y centrifugamos a 2500 rpm por 10 minutos para recuperar el plasma pobre en plaquetas, pero a diferencia del estudio previamente mencionado, solamente estudiamos concentraciones de nuestros extractos de 1000 y 500 mg/mL.

## 8.- CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* muestran propiedades antimicrobianas y coagulantes como alternativa terapéutica en Odontopediatría.

De los resultados obtenidos podemos concluir que se acepta parcialmente la hipótesis de estudio donde se afirma que los extractos de las plantas *Heterotheca inuloides*, *Mentha piperita* y *Amphyptergium adstringens* presentan actividad antimicrobiana en la evaluación antibacteriana *in vitro* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, ya que *Heterotheca inuloides* y *Amphyptergium adstringens* mostraron mejores resultados que *Mentha piperita*.

Los extractos que presentaron mayor potencial inhibitorio contra *S. mutans* fueron *Heterotheca inuloides* y *Amphyptergium adstringens*, aunque *H. inuloides* a una menor concentración que *A. adstringens*. En concentraciones de 1000µg/mL *A. adstringens* obtuvo el halo de mayor diámetro, indicando mayor inhibición bacteriana que los otros dos extractos. A concentraciones de 500µg/mL *H. inuloides* obtuvo el halo de mayor diámetro. A concentraciones de 250µg/mL y 125µg/mL también fue *H. inuloides* quien obtuvo el halo de mayor diámetro.

Al igual que contra *S. mutans*, *Heterotheca inuloides* y *Amphyptergium adstringens* obtuvieron el mayor potencial inhibitorio contra *S. sobrinus*. *A. Adstringens* fue el extracto con más potencial inhibitorio en concentraciones de 1000µg/mL y 500µg/mL, obteniendo el halo de inhibición de mayor diámetro. A concentraciones de 250µg/mL y 125µg/mL fue *H. inuloides* quien obtuvo el halo de mayor diámetro.

*Amphyptergium adstringens* fue el extracto con mayor diferencia estadística significativa en cuanto a su actividad antimicrobiana, sin embargo, fue el extracto con menos viabilidad celular en los resultados del FMCA, lo cual nos demuestra que este extracto presenta un grado de toxicidad a las concentraciones en las cuales fue probado.

*Menta piperita* fue el extracto con mejores resultados en cuanto a la prueba FMCA, obteniendo porcentajes de viabilidad celular mayores al 50%.

El promedio del menor tiempo de coagulación de acuerdo al tiempo de protrombina fue obtenido por cuachalalate a una concentración de 500 µg/mL, mientras que el mas alto fue obtenido por menta en concentración de 1000 µg/mL, por lo cual de acuerdo a estos resultados, menta a 1000 µg/mL funcionaría como un coagulante mientras que cuachalalate a 500 µg/mL funcionaría como un anticoagulante.

De acuerdo a los resultados obtenidos agregando los extractos estudiados, el promedio del menor tiempo de coagulación fue de árnicia en ambas concentraciones utilizadas. El promedio más alto fue obtenido por cuachalalate en un concentración de 1000 µg/mL. Existe una diferencia significativa en los tiempos de cuachalalate, los cuales se prolongan. Por lo tanto, cuachalalate a 1000 µg/mL se considera que puede interferir con el proceso de coagulación normal, actuando como un anticoagulante.

Por lo tanto, se considera que los extractos de *Heterotheca inuloides* y *Amphyptergium adstringens* son los más específicos para evaluar su desempeño como alternativa terapéutica en la Odontopediatria por su actividad antimicrobiana, no obstante, se recomienda que se realicen más estudios respecto a su selectividad contra mas bacterias cariogénicas, y concluyendo su efectividad continuar con estudios de citotoxicidad y mutagenecidad a diferentes concentraciones que las que fueron utilizadas en esta investigación para garantizar la seguridad para su uso clínico, ya que *Mentha piperita* rebasó a estos dos extractos en cuanto a viabilidad celular.

## REFERENCIAS

1. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. 2013. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol.* 169(8):1672-1692.
2. Aguilar Afay Yong, C. 2015. Efecto cicatrizante de una crema formulada con la tintura ártica montana “árnica” en heridas inducidas en el lomo de ratones albinos y comparación con el “Hipoglos crema”. Tesis (licenciatura). Universidad Alas Peruanas.
3. Ahmed, A. M., Ozbak, H. A., & Hemeg, H. A. 2015 Effect of essential oil of traditional two Saudi mint types and its possible role in cardiovascular and throat health. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 8(5): 8060–8068.
4. Amabeoku GJ, Erasmus SJ, Ojewole JA, Mukinda JT. 2009. Antipyretic and antinociceptive properties of *Mentha longifolia* Huds. (Lamiaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 31:645.
5. Apecechea Coffigny MR, Fano Viamonte R, Garrido MJ. 1998. Efecto in vitro de un extracto acuoso de las hojas de *Ricinus communis* sobre la formación del coágulo sanguíneo. *Rev Cubana Plant Med.* 3(2):62-63.
6. Arévalo M, Enciso A. 1996. Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de Espeletias encontradas en el páramo de Guasca. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregado. Bogotá D.C. Pág. 14,16 ,17 ,18 , 21, 22, 23, 24, 25.
7. Baris O, Karadayi M, Yanmis D, Guvenalp Z, Bal T, Gulluce M. 2007. Isolation of 3 flavonoids from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* and determination of their genotoxic potentials by using the E. coli WP2 test system. *J Food Sci.* 76:T212.

8. Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A. Odontopediatría. 2005. Ed. Masson.
9. Bonilla RC, Aguilar S, García G, Reyes Macedo V, Salinas Chino V, Aguilar Bautista C. 2004. Investigación y conservación de la guacamaya verde (*Ara militaris*) en la reserva de la biosfera Tehuacán- Cuicatlán. Fase II: Estudios para la conservación. Informe final de proyecto. I.P.N., CIIDIR-Oaxaca. 70p.
10. Bong CL, HilUard J, Seefelder C. 2009. Severe Methemoglobinemia From Topical Benzocaine 7.5% (Baby Orajel) Use for Teething Pain in a Toddler. Clin Pediatr (Phila). 48(2): 209-1.
11. Bordoni N, Escobar A, Castillo R. 2010. Odontología Pediátrica. La salud bucal del niño y el adolescente en el mundo actual. Ed. Médica Panamericana.
12. Cairns AM. 2011. Brush up on your technique: good habits start young. Fam Health Care. 21(5): 26-8 .
13. Carvajal Rojas L, Hasta Uribe Y, Sierra Martinez N, Rueda Niño D. 2009. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos Schultesiana* Krukoff). Rev Col For. 12: 161-170.
14. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. Phytother Res. 21:501.
15. Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K, Abdelly C. 2007. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. Mycoses. 50:403.
16. Chakraborty A, Devi RKB, Rita S, Singh IT. 2002 Local anaesthetic effect of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. Ind J ourl Pharm. 34:144–145.

17. Chandra Shekar BR, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. 2015. Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacognosy Reviews*, 9(18), 87–92.
18. Carretero Accame, ME. 2000. Compuestos fenólicos: Taninos, N° 235, Consejo General de Colegios Farmacéuticos. Panorama actual Med, p.633 y 634.
19. Carrilho M, Gerardeli S, Tay F, de Goes M, Carvalho R, Tjaderhane L, Reis A. 2007. In vivo Preservation of the Hybrid Layer by Chlorhexidine. *J Dent Res*. 86(6): 529 - 533.
20. Chung N, Batra R, Itzkevitch M, Boruchov D, Baldauf M. 2010. Severe methemoglobinemia linked to gel-type topical benzocaine use: a case report. *The Jour Of Emer Med*. 38(5):601-606.
21. Cruz-Carrillo A, Rodriguez N, Rodriguez CE. 2010. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*.
22. Dawson TM, Snyder SH. 1991. Epidemiology of heart failure. *Journal of Neuroscience* 14:5147-5149.
23. Delgado G, Olivares M, Chávez M, Ramírez T, Linares E, Bye R, Espinosa-García F. 2000. Antiinflammatory Constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64: 861-864.
24. Ferraz C, Gomes B, Zaia A, Teixeira F, Souza-Filho F. 2007. Comparative study of the antimicrobial efficacy of Chlorhexidine gel, Chlorhexidine solution and Sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 18 (4): 294-298.
25. Fogel CG. 2004. Signos y síntomas atribuidos a la erupción dentaria en los niños (primera parte). *Arch. argent. Pediatr.* 102(2):185-189.

26. García Bacallao L, Rojo Domínguez DM, García Gómez LV, Hernández Ángel M. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Rev Cubana Invest Biomed.* 21(3):214-6.
27. García DA, Patiño L, Rueda G. 2014. Medición de la citotoxicidad y producción de citocinas en fibroblastos gingivales humanos estimulados con Mercurius-Heel®S: Un estudio piloto. *Univ Sci.* 19(3):225-232.
28. Gauniyal P, Teotia UVS. 2014. Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against oral flora. *Asian Pac J Health Sci.* 1(3):255–63.
29. Gomez Estrada HA, Gonzalez Ruiz KN, Domingo Medina J. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 10(3):182-217.
30. Gonzalez-Stuart AE. 2010. Use of medicinal plants in Monterrey, Mexico. *Notulae Scientia Biologicae.* 2(4):7–11.
31. Grover R, Frank M. 2008. Regional specificity of Chlorhexidine effects on taste perception *Chem. Senses.* 33: 311-318.
32. Gutierrez VO, Pinheiro CM, Assis RP, Vendramini RC, Pepato MT, Brunetti IL. 2012. *Br J Nutr.* 108(3):440-8.
33. Hafedh H, Fethi BA, Mejdi S, Emira N, Amina B. 2010. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr J Microbiol Res.* 4:1122.
34. Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R. 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:2227.



35. Heredia J, Bonetti S, Rodriguez S. 2008. Uso de la Chlorhexidina en Endodoncia RAO. 93 (3): 245 - 248.
36. Holloway PJ, Moore WJ. 1983. The role of sugar in the etiology of dental caries. J Dent. 11(3):189–90.
37. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH. 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. J Sci Food Agric. 90:1827.
38. Jones C. 2000. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontol. 15: 55-62.
39. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ogütçü H, Sengül M, Adigüzel A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. J Ethnopharmacol. 85:231.
40. Kawakami AP, Sato C, Cardoso TN, Bonamin LV. 2011. Inflammatory Process Modulation by Homeopathic *Arnica montana* 6CH: The Role of Individual Variation. Evid Based Complement Alternat Med. 2011:917541.
41. Khan ST, Khan M, Ahmad J, Wahab R, Abd-Elkader O H, Musarrat J, Al-Kedhairy AA. 2017. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. AMB Express, 7, 49.
42. Khattak S, Rehman SU, Khan T, Shah HU, Shad AA, Ahmad M. 2004. In vitro screening for biological pharmacological effects of indigenous medicinal plants, *Mentha longifolia* and *Aloe vera*. J Chem Soc Pak. 26:248.
43. Kitic D, Jovanovic T, Ristic M, Palic R, Stojanovic G. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball from Montenegro. J Essent Oil Res. 14:150.

44. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. 2015. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Fron Cell Inf Micro*. 5:10.
45. Komorowski R, Grad H, Yu Wu X, Friedman S. 2000. Antimicrobial Substantivity of Chlorhexidine-Treated Bovine Root Dentin. *Jour End*. 26(6):315-317.
46. Kooa H, Gomesa B, Rosalena PL, Ambrosanoa GMB, Parkb YK, Curya JA. 2000. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Or Bio*. 45(2):141-148.
47. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. 2014. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 33:499–515.
48. Kumar A, Agarwal K, Maurya AK. 2015. Pharmacological and phytochemical evaluation of *Ocimum sanctum* root extracts for its antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities. *Pharmacognosy Magazine*. 2015;11.
49. Landim EV, de Carvalho MG, de Carvalho RA, Granville-Garcia AF, Lima Rde F, de Brito Costa EM. 2013. Assessment of gingival mucosa of infant rats during teething. *J Contemp Dent Pract*. 14(6):1009-13.
50. Loesche WJ. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 50:353–380.
51. López-Santiago N. 2016. Pruebas de coagulación. *Acta Pediatr Mex*. 37(4):241-245.
52. López V, Martín S, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Jäger AK, Calvo MI. 2010. Neuroprotective and neurochemical properties of mint extracts. *Phytother Res*. 24:869.
53. Mahbouubi M, Kazempour N, Songklanakarin J. 2014. Composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil. Thesis (PhD). *Sci. Technol*.

54. Mamani Curazi BI. 2013. Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre flora mixta salival. Tesis (maestría).
55. Manar M, Ahmad S, Al-Hiyasa T, Homa D. 2008. Toxicity Testing of Restorative Dental Materials using Brine Shrimp Larvae (*Artemiasalina*). *J Appl Oral Sci.* 16(4):297-301.
56. Maraví Inga GG. 2012. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. Tesis (maestría). Universidad Weiner.
57. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJL. 2013. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: A Systematic Analysis. *Jour Dent Res.* 92(7), 592–597.
58. Markman L. 2009. Teething: Facts and Fiction. *Pediatr Rev.* 30:59-64.
59. Márquez Vizcaíno R, De La Rosa C, Arrieta García EJ, Villalba Uparela J. 2005. Evaluación de la actividad coagulante in vitro del extracto total en etanol y fracciones de la corteza de *Brownea ariza* Bentham (Caesalpiniaceae). *Rev Dug.* 1(1).
60. Martinez-Hormaza I, Quintero-Rodriguez G, Marquez-Montiel L, Gonzalez-Lavut JA, Álvarez-Reyes A, Zarragoitia A. 2006. Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el Método de la Arteria salina. *Acta Farm. Bonaerense.* 25(3): 429-31.
61. Mathur S, Mathur T, Srivasta R, Khatri R. 2011. Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. *Nat Jour Phis Pharm Pharmacol.* 1 (2): 45-50.
62. Mc. Coy L, Wehler C, Rich S, García R, Miller D, Jones J. 2008. Adverse events associated with chlorhexidine use: Results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes study. *JADA* 139 (2): 178-183.

63. McLaughlin JL, Lingling LR, Anderson JE. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.* 32:513-524.
64. Memarpour M, Soltanimehr E, Eskandarian T. 2015. Signs and symptoms associated with primary tooth eruption: a clinical trial of nonpharmacological remedies. *BMC Or Hea.* 15:88.
65. Mesa MD, Ramírez-Tortosa MC, Aguilera CM, Ramírez-Boscá A, Gil A. 2000 Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides. *Ars Pharmaceutica.* 41(13):307-321.
66. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45:31-34.
67. NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement, NCCLS M100-s8 (ISBN 1-56238-337-X), Wayne Pennsylvania; USA, 1998.
68. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003 Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *Jour Nat Prod.* 66: 1022-1037.
69. Nobbs, A. 2017. Getting to the heart of the matter: Role of *Streptococcus mutans* adhesin Cnm in systemic disease. *Virulence.* 8(1), 1–4.
70. Noor-Mohammed R, Basha S. 2012. Teething disturbances; prevalence of objective manifestations in children under age 4 months to 36 months. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 17:3.
71. Palombo EA. 2011. Traditional Medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid Based Compliment Alternat Med.* 13:5.

72. Petersen PE. 2003. The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century- -the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol. 31(1):3–23.
73. Petti S, Hausen H. 2006. Caries Preventive Effect of Chlorhexidine Gel Applications among High-Risk Children. Caries Res. 40: 514 - 521.
74. Ramos-Jorge J, Ramos-Jorge ML, Martins-Júnior PA, Corrêa-Faria P, Pordeus IA, Paiva SM. 2013. Mothers' reports on systemic signs and symptoms associated with teething. Dent Child. 80(3):107-10
75. Ríos V, Romero N, Valencia C, Balanta J. 2014. Métodos para determinar la biocompatibilidad en materiales dentales. Rev estomatol. 22(2):7-12.
76. Robles Bermeo L, Guadarrama Reyes S, Morales Luckie R. 2013. Efecto Antibacteriano de las nanopartículas de plata versus clorhexidina sobre streptococcus mutans y lactobacillus casei. Tesis (maestría). Universidad Autónoma de Mexico.
77. Rocha Gomez MM. 2015. Elaboración de una biopelícula bioadhesiva incorporando *Amphipteryngium adstringens* (Cuachalalate) para su uso en mucosa oral. Tesis (maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León.
78. Rodríguez-Chavez JL, Egas V, Linares E, Bye R, Hernández T, Espinosa-García FJ, Delgado G. 2016. Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. J Ethnopharmacol. 2016:31834.
79. Rodríguez-García A, Peixoto I, Verde-Star MJ, De la Torre-Zavala S, Aviles-Arnaut H, Ruiz A. 2015. In Vitro Antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Amphipteryngium adstringens*. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:175497.

80. Rodriguez Vicente J, Vicente Ortega V, Canteras Jordan M. 1997. Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma. *Patología*.30(1):18-27.
81. Rzedowski GC, Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
82. Shaheen SS, Reddy P, Hemalatha, Reddy S, Doshi D, Kulkarni S. 2015. Antimicrobial efficacy of ten commercially available herbal dentifrices against specific oral microflora – In vitro study. *J Clin Diagn Res*. 9(4):ZC42–46.
83. Sheiham A. 2005. Oral health, genral health and quality of life. *Bull World Health Organ*. 83:644–5.
84. Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM, Agra MF, Camara CA. 2007 Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Braz J Pharmacogn*. 17(1):35-38.
85. Singh H, Kapoor P, Meshram G, Warhadpande M. 2011. Evaluation os substantivity of chlorhexidine to human dentin and its application in adhesive dentistry-an in vitro analysis. *Ind Jour Dent*. 2:8-10.
86. Siqueira JF, Rocas IN. 2005. Exploiting molecular methods to explore endodontic infection: Part 2-redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 31(7):488–98.
87. Sotelo I, Casas N, Camelo G. 2010. Borojó (*Borojoa patinoi*): Fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Vitae*. 17(3): 329-336.
88. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Viana ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. 2008. Antimicrobial Effect and Ph of Clorhexidine Gel and Calcium Hydroxide alone and associated with other materials. *Braz. Dent J*. 19 (1):28-33.

89. Suárez Pérez Y, García Pulpeiro O, Al-Sufi Fathel MA. 2001. Diseño y validación de un método espectrofotométrico para el estudio de estabilidad de Benzocaína en un nuevo ungüento rectal. *Rev Cubana Farm.* 35(3): 171-180.
90. Thompson EA, Bishop JL, Northstone K. 2010. The use of homeopathic products in childhood: Data generated over 8.5 years from the avon longitudinal study of parents and children (ALSPAC). / *Altern Complement Med.* 16(1): 69-79.
91. Ullfoss B, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rolla G, Afseth J. 1994. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study *Scand Dent Res.* 102 (2): 109-112.
92. Van der Anker JN 2013. Optimising the management of fever and pain in children, *Int Clin Pract Suppl.* 178: 26-32.
93. Van der Weijden GA, Timmer CJ, Timmerman MF, Reijerse E, Mantel MS, Vander Velden U. 1998. The effect of herbal extracts in an experimental mouth rinse on established plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.* 25(5):399–403.
94. Vanhaecke P, Persoone G. 1984. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. *Ecotox Test Mar Environ.* 1984:143-157.
95. Varó I, Serrano R, Navarro JC, Lopez FJ, Amat F. 1998. Acute Lethal Toxicity of the Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos to Different Species and Strains of *Artemia*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 61:778-785.
96. Villalobos OJ, Salazar V, Carmen R, Ramírez de Sánchez G. 2001. Efecto de un enjuague bucal compuesto de aloe vera en la placa bacteriana e inflamación gingival. *Acta odontol venez.* 39(2):16-24.

97. Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming HC. 2001. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol.* 336:302–314.
98. Woods G, Washington J. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods. *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth edition. Washington D.C., 1995.
99. Zanatta F, Antoniazzi R, Rosing C. 2007. The effect of 0.12% Chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 78 (11): 2127-2134.
100. Ziegler J, Facchini, PJ. 2008. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 59: 735–769.
101. Zimring JC, Hillyer CD, Shaz BH, Abshire TC. Introduction to coagulation testing. En *Transfusion Medicine and hemostasis, Clinical and laboratory aspects*. Elsevier. Nueva York. 2009, pp. 601-605.
102. Zimring JC, Hillyer CD, Shaz BH, Abshire TC. Prothrombin time and activated partial throm- boplastin time. En *Transfusion Medicine and hemostasis, Clinical and laboratory aspects*. Elsevier, Nueva York. 2009, pp. 607-610.